

ZUR PRIMÄRSTRUKTUR DES ACYL CARRIER PROTEINS VON FETT-
SÄURESYNTHETASE AUS HEFE.

AMINOSÄURESEQUENZ EINES 4'-PHOSPHOPANTETHEIN ENTHALTEN-
DEN PEPTIDS

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der

Ludwigs-Maximilian-Universität

München

vorgelegt

von

Thomas Schreckenbach

München 1975



- I. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
II. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 3. 1975

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1971 bis November 1974 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen am Biochemischen Institut der Universität München und am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, ausgeführt.

Herrn Professor Dr. F. Lynen danke ich herzlich für das Interesse, welches er mir und meiner Arbeit zuteilwerden ließ.

Herrn H. Wobser danke ich für seine ausgezeichnete, zuverlässige Mitarbeit seit Oktober 1973.

Der Max-Planck-Gesellschaft und ganz besonders Herrn Professor Dr. F. Lynen danke ich herzlich für die großzügige Ermöglichung und die vollständige Finanzierung des EMBO-Kurses "Protein Sequence Analysis" unter Leitung von I. Harris und R. Perham, März 1974, in Cambridge.

Frau Dr. A. Henschen-Edman bin ich für ihre wertvollen Anregungen und für die Diskussion von Ergebnissen zu großem Dank verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Charakterisierung der Acceptorgruppen	6
III. Synthese und Reinigung von (1- ¹⁴ C)Palmityl-CoA	8
IV. Markierung der Acceptorgruppen und Entfernung von nicht kovalent gebundenem (¹⁴ C)Palmityl-CoA	11
V. Tryptische Spaltung des (¹⁴ C)Palmityl-Enzyms und Trennung der Spaltprodukte	15
1. Spaltung, Extraktion der Palmitylpeptide, Papiererelektrophorese	15
2. Trennung von Palmitylpeptiden und wasserlösli- chen Peptiden	19
3. Auftrennung der Palmitylpeptide	23
VI. Unterscheidung von Sauerstoffestern und Thioestern	28
VII. Beladung von FSS mit Jodacetamid und (1- ¹⁴ C)Palmi- tyl-CoA	33
VIII. Charakterisierung der tryptischen Palmitylpeptide	
T ₁ - T ₇	35
1. Übersicht	35
2. Charakterisierung von ACP-Peptid T ₂	38
a) Endgruppenbestimmung	38
b) Serin als Träger des 4'-Phosphopantethein- Rests	39
c) Sequenz des Peptids T ₂	43
3. Diskussion der Ergebnisse	47
a) Zur Struktur des ACP von FSS aus Hefe	47
b) Zur Struktur des kondensierenden Enzyms	49
IX. Charakterisierung der Palmityltransferase in Fett- säuresynthetase aus Hefe	51
1. Vorbemerkung	51
2. Anreicherung der peptischen Peptide P ₁ und P ₂	51
3. Aminosäureanalyse und Teilsequenz der Peptide P ₁ und P ₂	54
4. Diskussion der Ergebnisse	59

X.	Experimenteller Teil	61
1.	Verwendete Geräte	61
2.	Chemikalien, Substrate	62
3.	Verzeichnis der verwendeten Lösungsmittelsysteme	63
4.	Allgemeine analytische Methoden	63
	a) Proteinbestimmung	63
	b) Radioaktivitätsbestimmung	63
	c) Gehaltsbestimmung von Thioestern	64
	d) Autoradiographie	64
5.	Isolierung und Aktivitätsbestimmung von Fettsäure- synthetase	64
6.	Synthese und Reinigung von (1- ¹⁴ C)Palmityl-CoA	65
7.	Markierung der Acceptorgruppen, Entfernung von überschüssigem Palmityl-CoA (zu Kap. IV und VII)	66
8.	Tryptische Spaltung von (¹⁴ C)Palmityl-FSS (zu Kap. V,1)	67
	a) Spaltung und Extraktion	67
	b) Papierelektrophorese	67
9.	Säulenchromatographie (zu Kap. V,2)	69
	a) Verteilungschromatographie an Sephadex G 50	69
	b) Chromatographie an Sephadex LH ₂₀	69
10.	Präparative Dünnschichtchromatographie (zu Kap. V,3)	70
11.	Perameisensäureoxidation (zu Kap. VI)	72
12.	Aminosäureanalyse (zu Kap. VIII,1 und IX,3)	72
13.	Endgruppenanalyse (zu Kap. VIII, 2a)	73
14.	Serinspaltung (zu Kap. VIII, 2b und IX, 3)	74
15.	Sequenzanalyse (zu Kap. VIII, 2c und IX,3)	75
16.	Peptische Spaltung (zu Kap. IX,2)	77
XI.	Zusammenfassung	78
XII.	Literaturverzeichnis	80
	Lebenslauf	83

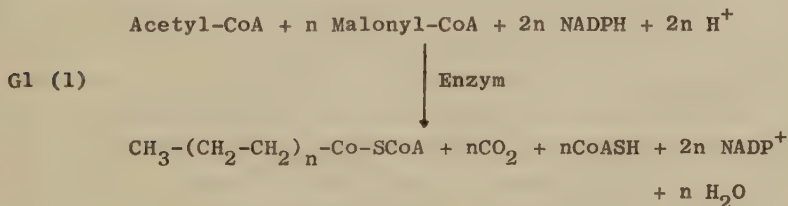
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACP	acyl carrier protein
Butyl-PBD	2-(4'-t-butylphenyl)-5-(4'-biphenyl)-1,3,4-oxdiazol
CoA, CoA-SH	Coenzym A
Dansyl	Dimethylamino-naphthalinsulfonyl-Rest
dest.	destilliert
DC	Dünnschichtchromatographie
E, mE	Einheit, Millieinheit
E	Extinktionsänderung
FMN	Flavinmononucleotid
FSS	Fettsäuresynthetase
Ipm	Impulse pro Minute
JAA	Jodacetamid
Lsgm	Lösungsmittel
LDH	Lactatdehydrogenase
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
PE	Papierelektrophorese
P _{1,2....}	Peptische Peptide 1,2....
PTH-	Phenylthiohydantoinderivat
PITC	Phenylisothiocyanat
PAS	Perameisensäure
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	1.4-bis-2(5-phenyloxazol)-benzol
T _{1,2....}	Tryptische Peptide 1,2....
TPCK	N-tosyl-L-phenylalanylchloromethan
TFA	Trifluoressigsäure
UPM	Umdrehungen pro Minute
Vo	Äußeres Volumen einer Sephadex-Gelpackung

I. EINLEITUNG

Die Synthese von Fettsäuren in lebenden Zellen stellt ein Beispiel der sogenannten Polyacetatregel dar. Diese Regel besagt, daß durch eine Kopf-Schwanz-Kondensation von Essigsäuremolekülen das Kohlenstoffgerüst größerer Moleküle gebildet wird (1).

Die Synthese der langkettigen Fettsäuren weist zudem eine weitere Besonderheit auf: Alle Reaktionen laufen auf dem hohen Energieniveau von Thioestern ab (2). Die Fettsäuresynthese verläuft in allen bisher untersuchten Organismen gemäß der folgenden Bruttoreaktion. Ausgangsprodukte sind die C_2 -Acylreste von Acetyl- und Malonyl-CoA (3).



Endprodukte in dem Organismus Hefe sind die CoA-Derivate der höheren Fettsäuren Palmitin- bzw. Stearinsäure (3). In tierischem Gewebe und in Pflanzen entstehen dagegen die freien Fettsäuren (4,5).

Zur Katalyse der Reaktion (Gl. 1) bedient sich die Natur komplizierter Enzymsysteme. Diese bestehen in Bakterien und Pflanzen aus einzelnen, d.h. einzeln isolierbaren Enzymen. In Hefe oder tierischem Gewebe wird dagegen die Fettsäuresynthese gemäß Gl. 1 von Multienzymkomplexen, stabilen Aggregaten von Einzelenzymen, katalysiert (6,7,3,8,9,5).

Der Malonylrest hingegen wird von Malonyl-CoA auf die "zentrale" SH-Gruppe des "acyl carrier protein" (ACP) überführt. In dem nun folgenden Kondensationsschritt wird unter Decarboxylierung ein Acetoacetylrest gebildet. Dieser ist als Thioester an die zentrale SH-Gruppe des ACP gebunden. Bei den anschließenden Reaktionssschritten verbleibt der Acylrest am ACP. Dieses dient auf Grund seiner noch besonders zu erwähnenden Eigenschaften (s.u.) als Transportarm und bringt das Substrat mit den aktiven Zentren der benachbarten Enzymfunktionen in Kontakt. Durch Reduktion, Dehydratisierung und erneute Reduktion wird der Acetoacetyl-Rest in einen (ACP-gebundenen) Butyrylrest umgewandelt. Auf dieser Synthesestufe ist somit die gesättigte Fettsäure um eine C_2 -Einheit aus Malonyl-CoA verlängert worden. Durch Überführung des Butyrylrestes auf die zentrale SH-Gruppe wird die Verlängerung um eine weitere C_2 -Einheit ermöglicht: Alle Reaktionen laufen dabei wie oben beschrieben ab. Der Butyrylrest übernimmt die Funktion des Acetylrests in der Startreaktion. Auf diese Weise werden durch sukzessive Einführung von C_2 -Einheiten aus Malonyl-CoA Endprodukte der Kettenlänge C_{16} - C_{18} gebildet. Diese werden in einer abschließenden Transferreaktion auf Coenzym A übertragen und stehen von diesem Zeitpunkt an dem weiteren Stoffwechsel der Zelle zur Verfügung.

Wie schon erwähnt, hat das ACP die wichtige Funktion, das Substrat als kovalent gebundenen Thioester zu transportieren. Zu dieser Funktion wird es durch die Struktur seiner prosthetischen Gruppe befähigt (8,11), welche in Abb. 2 dargestellt ist.

Abb. 2 zeigt, daß ein in der Polypeptidkette des Proteins fixiertes Serin über eine Phosphatbrücke einen Pantetheinrest trägt. Dieser enthält die seltene Aminosäure β -Alanin. Am Ende des 20 Å langen Arms (12) ist ein Cysteaminrest gebunden, dessen SH-Gruppe mit der vorher erwähnten zentralen SH-Gruppe identisch ist.

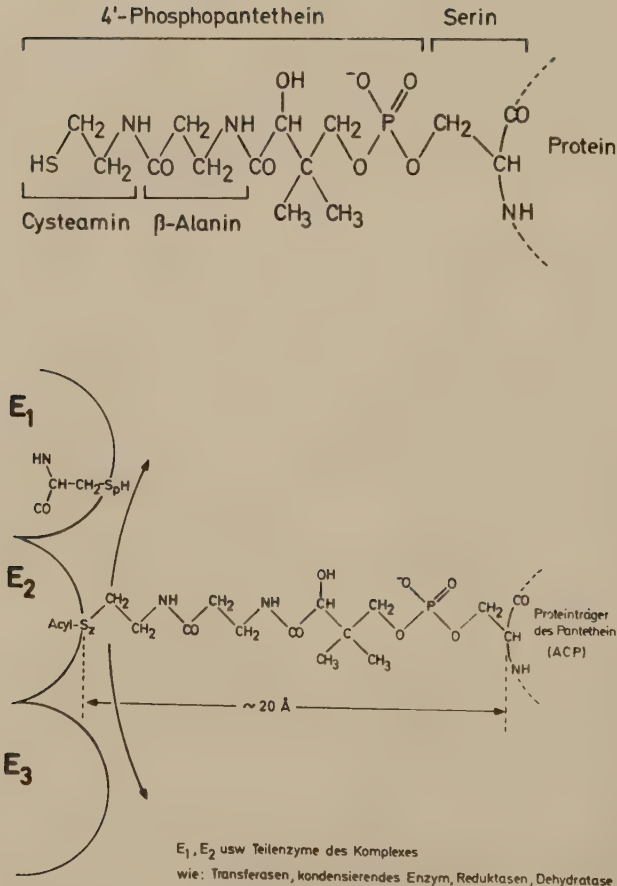


Abb. 2: Struktur des 4'-Phosphopantetheins und schematische Darstellung seiner Funktion im ACP von Fettsäuresynthetase aus Hefe.

SpH, SzH: "periphere" bzw. "zentrale" SH-Gruppen.

Die Funktion dieses 'carrier' ist ein wesentlicher Aspekt bei der Betrachtung der Funktion von Multienzymkomplexen. Durch ihn wird in diesem Fall das ermöglicht, was den biologischen Vorteil von Multienzymkomplexen darstellt: Ein vielstufiger Syntheseprozess wird durch ein hochorganisiertes, stabiles Aggregat von Enzymen katalysiert. Zwischenprodukte werden vom Komplex nicht freigegeben. Die kovalente Bindung des Substrats an das ACP entspricht einer optimalen Substratkonzentration für die jeweilige enzymatische Umsetzung (12).

Ziel dieser Arbeit war es, die Aminosäureumgebung des 4'-Phosphopantetheins des ACP von FSS aus Hefe aufzuklären und sie mit bereits bekannten (Teil-)Sequenzen von "acyl carrier"-Proteinen aus anderen Organismen zu vergleichen.

II. CHARAKTERISIERUNG DER ACCEPTORGRUPPEN

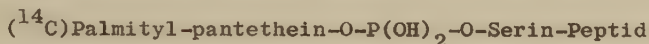
Die Endprodukte der Fettsäuresynthese in Hefe werden durch Übertragung des langkettigen Acylrestes auf Coenzym A als Stearyl- bzw. Palmityl-CoA vom Multienzymkomplex freigegeben. Andererseits kann durch Inkubation von FSS mit Palmityl-CoA unter Umkehrung dieser Reaktion Palmityl-FSS gebildet werden (13,14). Dabei ist zu erwarten, daß die Palmitinsäure kovalent an das ACP, an das aktive Zentrum des kondensierenden Enzyms und an die Palmityltransferase gebunden wird.

Nach Untersuchungen von Schweizer befinden sich alle Enzymfunktionen von FSS aus Hefe auf nur zwei Polypeptidsträngen (15,17). Das ACP des Enzyms liegt, anders als z.B. bei *E. coli* (16), nicht als einzelnes Protein vor. Es ist in eine der beiden Polypeptidketten integriert. Proteinchemische Arbeiten am ACP von FSS aus Hefe setzen daher einen proteolytischen Abbau des Gesamtproteins voraus. So konnte Ayling nach Inkubation von FSS mit (^{14}C)-Palmityl-CoA und peptischer Spaltung Peptide isolieren, welche (^{14}C)Palmitinsäure in kovalenter Bindung enthielten. Zwei dieser Peptide schrieb sie dem ACP zu, eines dem kondensierenden Enzym, 3 weitere der Palmityltransferase (14).

Die Beladung von FSS mit (^{14}C)Palmitat sollte auch in der vorliegenden Arbeit dazu verwendet werden, ein - in diesem Fall tryptisches - ACP-Peptid zu isolieren und zu sequenzieren. Aus dem oben Gesagten geht hervor, daß mit dem Auftreten weiterer Palmitylpeptide zu rechnen ist. Die durch den kovalent gebundenen Palmitatrest verursachte Lipophilie der Peptide (14) sollte für ihre Anreicherung ausgenützt werden.

Um einen Überblick über die im folgenden beschriebenen Arbeiten zu geben, sollen die erwähnten drei Palmitat-Bindungsstellen kurz charakterisiert werden:

- 1) ACP: Das ACP bindet Acylreste als Thioester des Cysteamins (vgl. Abb. 2). Aus seiner Struktur ist weiterhin ersichtlich, daß es ein β -Alanin pro Mol enthält. Ein aus dem ACP durch proteolytische Enzyme freigesetztes Peptid sollte daher die folgende Struktur haben:



Es muß im weiteren folgende Bedingungen erfüllen:

- a) Das Verhältnis (^{14}C) Palmitinsäure : Cysteamin : β -Alanin muß 1 : 1 : 1 sein.
- b) (^{14}C) Palmitinsäure muß durch Perameisensäure-(PAS)-Oxidation aus der Bindung an Cysteamin freigesetzt werden (Thioester sind oxydationsempfindlich (20)).

2) Kondensierendes Enzym:

Untersuchungen von Hagen (18) und Oesterheld (19) haben ergeben, daß die SH-Gruppe im aktiven Zentrum des kondensierenden Enzyms mit der SH-Gruppe eines Cysteinrestes identisch ist. Ein Palmitylpeptid aus dem aktiven Zentrum des kondensierenden Enzyms muß daher

- a) PAS-labil sein
- b) stöchiometrische Mengen an Cystein enthalten.

3) Palmityltransferase:

Nach Ergebnissen von Ayling (14) ist in einem (^{14}C) Palmitylpeptid dieses Enzyms die Palmitinsäure kovalent an die OH-Gruppe eines Serinrestes gebunden. Als Bedingung für ein Transferasenpeptid ist daher zu stellen:

- a) Es muß PAS-stabil sein.
- b) Es muß Serin enthalten.

III. SYNTHESE UND REINIGUNG VON (1-¹⁴C)PALMITYL-CoA

Die Synthese von Palmityl-CoA erfolgte nach der Methode von Wieland (21) über das gemischte Anhydrid von Chlorameisensäureäthylester und Palmitinsäure, wie in (22) beschrieben.

Das Produkt wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf seine radiochemische Reinheit geprüft. Abb. 3 zeigt, daß nach Chromatographie auf Kieselgelplatten im Laufmittel B (Phenol:Butanol:H₂O:Eisessig = 2 : 2 : 1 : 1) neben dem Hauptprodukt noch diverse radioaktive Verunreinigungen nachweisbar sind.

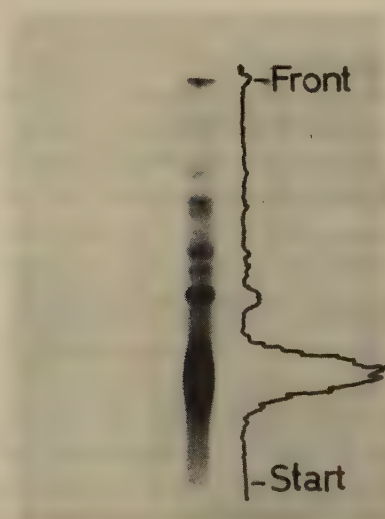


Abb. 3: Analytische Dünnschichtchromatographie von (1-¹⁴C)-Palmityl-CoA

Abbildung des Autoradiogramms sowie des Dünnschichtscanner-Diagramms.

Probe: ca. 100 000 cpm = 40 nMol. Kieselgel (0.25 mm), Laufmittel: Phenol:Butanol:H₂O:Eisessig = 2:2:1:1, Laufzeit: 4 h.

Mit dem Dünnschichtscanner wurden die Intensitäten der radioaktiven Banden verglichen. Nur bei Verwendung frischer Coenzym-A-Präparate war die radiochemische Reinheit des Produkts höher als 90 % (vgl. Abb. 3).

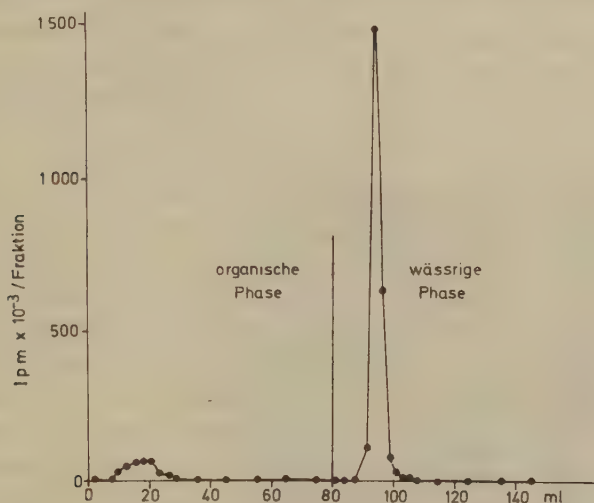


Abb. 4: Verteilungschromatographie von (¹⁴C)Palmitoyl-CoA an Sephadex G-50.

Säule: 1 x 55 cm; Vo = 10 ml; Durchfluß 90 bzw. 40 ml;
Fraktionsvolumen: 3,4 bzw. 1,4 ml; wässrige Phase: 0.2 M
Pyridin-Acetat Puffer, pH 6.2, 5 % Methanol; Organische Phase:
Essigester mit Puffer gesättigt.

Um die Verfälschung späterer Ergebnisse zu vermeiden, wurde das (¹⁴C)Palmitoyl-CoA in Zweifelsfällen nach der Methode von Schultz (22) gereinigt. Hierzu wurde es einer Verteilungschromatographie (Essigester/H₂O) an Sephadex G 50 unterworfen (Experimentelle Einzelheiten s. S. 65). Stationäre Phase war in wässrigem Puffer gequollenes Gel. Nach Auftragen der Probe wurde zuerst mit

organischer Phase, dann mit wässriger Phase eluiert. Abb. 4 zeigt ein typisches Elutionsdiagramm.

Die beiden radioaktiven Gipfel wurden getrennt aufgearbeitet und erneut der analytischen Dünnschichtchromatographie unterworfen. Abb. 5 zeigt das Ergebnis. Es ist ersichtlich, daß in der organischen Phase die Verunreinigungen angereichert sind.

Die wässrige Phase enthielt ($1-^{14}\text{C}$)Palmityl-CoA in einer radiochemischen Reinheit von 90-95 %.

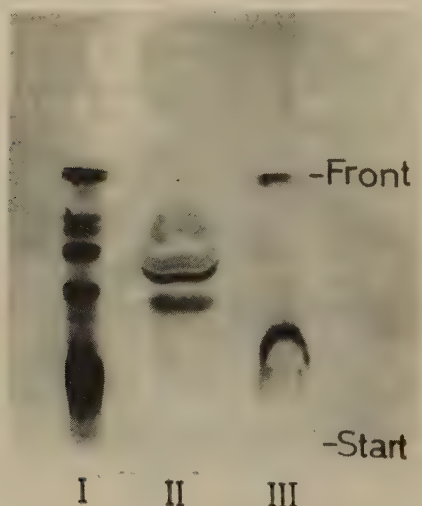


Abb. 5: Analytische Dünnschichtchromatographie von (^{14}C)Palmityl-CoA nach Verteilungschromatographie an Sephadex G 50 (22).

I Palmityl-CoA vor Reinigungsschritt

II mit organischer Phase eluierte Verunreinigungen

III mit wässriger Phase eluiertes Produkt

Kieselgel (0.35 mm), Laufmittel: Phenol:Butanol: H_2O :Eisessig = 2 : 2 : 1 : 1, Laufzeit 4 h.

IV. MARKIERUNG DER ACCEPTORGRUPPEN UND ENTFERNUNG VON NICHT KOVALENT GEBUNDENEM (^{14}C)PALMITYL-CoA

Fettsäuresynthetase wurde mit ($1\text{-}^{14}\text{C}$)Palmityl-CoA (spezifische Radioaktivität ca. $1\text{ }\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) inkubiert (14), wie im experimentellen Teil beschrieben. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines großen Überschusses Butanol gestoppt und das denaturierte Protein abzentrifugiert. Maximal 50 % der zugegebenen Radioaktivität befand sich im klaren Überstand. Das isolierte, mit Äther gewaschene und getrocknete Protein war, wie zu erwarten, mit nicht kovalent gebundenem (^{14}C)Palmityl-CoA verunreinigt: Wenn ein Aliquot in Ameisensäure gelöst und der Dünnschichtchromatographie in Laufmittel B (s.S. 63) unterworfen wurde, zeigte das Autoradiogramm eine Auftrennung des radioaktiven Materials in zwei Banden. Die Schwärzung am Start (R_f -Wert 0) war kovalent proteingebundener (^{14}C)Palmitinsäure zuzuschreiben, die zweite Bande (R_f -Wert 0.25) freiem (^{14}C) Palmityl-CoA. Dieses freie Palmityl-CoA erwies sich als störend bei der späteren Isolierung von Peptiden, da es von ihnen nur dünn-schichtchromatographisch abgetrennt werden kann. Wegen der geringen Trennkapazität präparativer Dünnschichtplatten war daher mit Überladungseffekten zu rechnen. Überdies bestand die Gefahr, daß mitgeschlepptes Palmityl-CoA später die Aminosäureanalyse des ACP-Peptids stören könnte, da sowohl Peptid als auch Coenzym A β -Alanin und Taurin (nach PAS-Oxydation des Cysteamins) enthalten.

Ayling (14) hatte durch dreifachmaliges Waschen des Proteins mit einem Butanol/Äthanol/HCl-Gemisch eine fast vollständige Abtrennung des nicht kovalent gebundenen Palmityl-CoA erreicht. Bei Anwendung dieser Methode müssen relativ große Proteinverluste in Kauf genommen werden (30-50 %). Durch Verwendung eines hochtourigen Homogenisators können die Verluste geringer gehalten werden (maximal 20 %); experimentelle Einzelheiten werden auf S. 66 erläutert.

Den Verlauf des Waschvorgangs gibt Abb. 6 wieder. Es ist ersichtlich, daß bereits nach fünfmaligem Waschen mit dem Lösungsmittelsystem Butanol:Äthanol:0.03 N HCl = 1:1:1 die Radioaktivität im

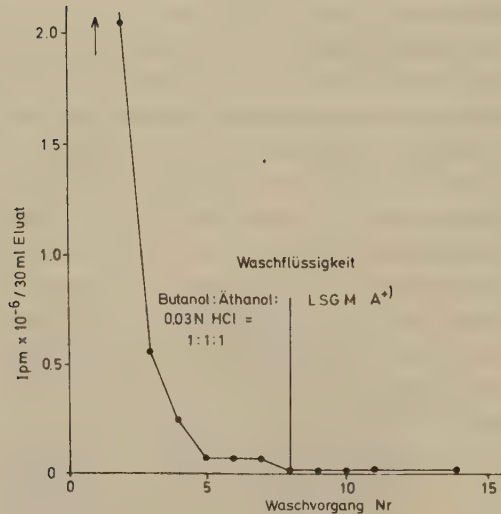


Abb. 6: Reinigung denaturierter (^{14}C)Palmityl-FSS von freiem (^{14}C)Palmityl-CoA im Homogenisator Omnimix (Servall)
Waschflüssigkeiten wie angegeben (30 ml pro Waschvorgang)
Protein: 1200 mg Ausbeute: 80 %
+) Butanol/ H_2O -Oberphase, 1 % Eisessig

Eluat auf einen konstanten Wert absinkt. Abb. 7 zeigt einen dünnschichtchromatographischen Vergleich der Eluate. Hierzu wurde ein Aliquot des jeweiligen Waschvorgangs chromatographiert. Der Abbildung kann entnommen werden, daß sowohl freies Palmityl-CoA als auch die das Palmityl-CoA begleitenden Verunreinigungen sehr effektiv vom Protein entfernt werden.

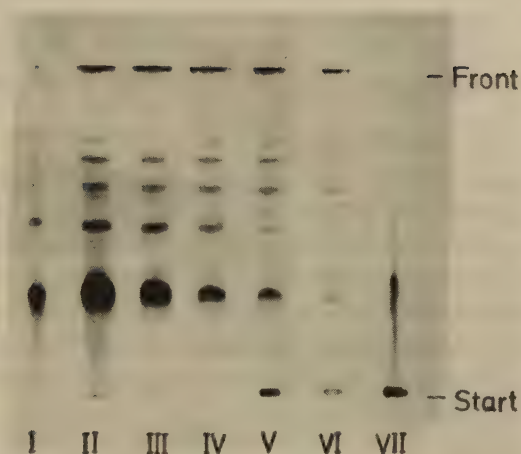


Abb. 7: Reinigung denaturierter (^{14}C)Palmityl-FSS von freiem Palmityl-CoA im Homogenisator Omnimix (Servall). Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Waschgänge.

- I Zur Beladung verwendetes (^{14}C)Palmityl-CoA
- II-VI Aliquot der jeweiligen Waschflüssigkeit von Homogenisationsschritt 1-5
- VII Aliquot des gewaschenen Proteins, in Ameisensäure gelöst.

Kieselgel (0.25 mm), Laufmittel: Phenol:Butanol: H_2O : Eisessig = 2 : 2 : 1 : 1, Laufzeit 4 h.

Abb. 7, VII zeigt ein Aliquot des gewaschenen Proteins, in Ameisensäure gelöst zur Chromatographie eingesetzt. Das immer noch als Verunreinigung nachweisbare Palmityl-CoA machte, in verschiedenen Ansätzen, 5-10 % der Gesamtradioaktivität aus.

Aus den Abb. 6 und 7 ist zu entnehmen, daß die konstante Menge Radioaktivität in den Eluaten 6, 7 ff auf konstante Mengen gelösten oder mitgerissenen Proteins und geringe Restmengen von freiem Palmityl-CoA zurückzuführen ist. Um größere Proteinverluste zu vermeiden, wurde auf weiteres Waschen verzichtet. Noch verbliebenes freies Palmityl-CoA war bei der Anreicherung der Peptide leicht abtrennbar (vgl. Kap. V, 3, S. 23).

Aus dem so gereinigten Protein konnte mit Lösungsmittel A keine weitere Radioaktivität extrahiert werden (vgl. Abb. 6). Wie im nächsten Kapitel beschrieben, diente dieses Lösungsmittel zur Extraktion der Palmitylpeptide aus dem Rückstand der tryptischen Spaltung. Somit ist ca. 95 % der am Protein verbliebenen Radioaktivität auf kovalent gebundene (^{14}C)-Palmitinsäure zurückzuführen und wird erst durch Einwirkung von Trypsin in lösliches Material überführt.

Die spezifische Radioaktivität des denaturierten und gewaschenen Enzyms betrug 5-6 nMol (^{14}C)Palmitinsäure/mg Protein.

V. TRYPTISCHE SPALTUNG DES (^{14}C)PALMITYL-ENZYMS UND TRENNUNG DER SPALTPRODUKTE

1. Spaltung, Extraktion der Palmitylpeptide, Papierelektrophorese

Ayling (14) hatte für die proteolytische Spaltung von (^{14}C)-Palmityl-FSS Pepsin gewählt. Im vorliegenden Fall wurde Trypsin als Protease verwendet. Trypsin spaltet Proteine an der -COOH-Gruppe der Aminosäuren Lysin und Arginin (23). Auf Grund dieser hohen Spezifität war zu erwarten, daß eine kleinere Zahl von radioaktiven Peptiden mit möglicherweise größerem Molekulargewicht und Lysin bzw. Arginin am COOH-Terminus aus dem Protein freigesetzt würden.

Während das pH-Optimum von Pepsin weit im sauren Bereich liegt (pH 2), entfaltet Trypsin seine maximale Aktivität zwischen pH 8 und pH 9 (23). Da (^{14}C)Palmityl-FSS esterartig gebundene Palmitinsäure enthält, muß jedoch die proteolytische Spaltung bei einem pH-Wert unter 7.00 durchgeführt werden, um eine Hydrolyse der Esterbindungen zu vermeiden. Es war bekannt (24,25), daß eine tryptische Spaltung von Proteinen auch zwischen pH 6 und 7 möglich ist. Die geringere Aktivität des Trypsins kann in solch einem Fall durch längere Reaktionszeiten und höhere Proteasekonzentration ausgeglichen werden. Ziegenhorn (24) hatte festgestellt, daß die Reaktion von (^{14}C)Acetyl-O-Serin-FSS mit Trypsin bei pH 6.9 und 37°C nach 15 h beendet ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war jedoch die Isolation des ACP-Peptids, in dem der Acylrest thioesterartig an Cysteamin gebunden ist. Wegen der größeren Reaktivität von Thioestern schien es geraten, erneut die optimalen Spaltungsbedingungen zu ermitteln.

(^{14}C)Palmityl-FSS wurde unter den auf S.67 angegebenen Bedingungen in einem Autotitrator mit 15 % der Gewichtsmenge an Trypsin inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquote gleichen Volumens der Suspension entnommen, die entstandenen Peptide extrahiert (vgl. S. 17 und experimenteller Teil S.67) und der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel in Laufmittel B

unterworfen. Das Autoradiogramm der Dünnschichtplatte wird in der folgenden Abbildung gezeigt. Ein Kontrollversuch (Behandlung von (^{14}C)Palmityl-CoA mit Trypsin) wurde durchgeführt und ergab, daß Palmityl-CoA durch Trypsin nicht modifiziert wird.

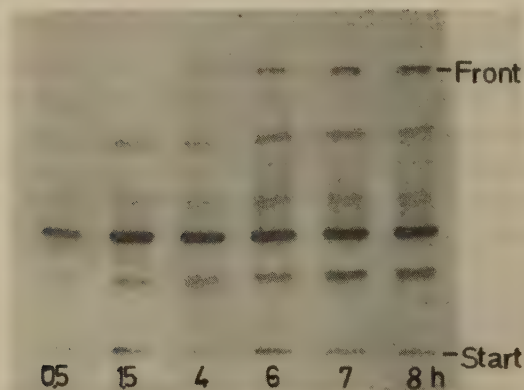


Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der tryptischen Spaltung von (^{14}C)Palmityl-FSS. Dünnschichtchromatographie der nach der angegebenen Zeit entnommenen radioaktiven Spaltprodukte. Experimentelle Einzelheiten werden auf S. 67 erläutert.

Kieselgel (0.25 mm), Laufmittel: Phenol:Butanol: H_2O :Eisessig = 2: 2 : 1 : 1, Laufzeit: 4 h, Probematerial: 5000-10000 cpm = 2 - 4 nMol inkorporierte (^{14}C)Palmitinsäure. Zur weiteren Deutung des Versuchs vgl. den folgenden Text.

Aus Abb. 8 ist ersichtlich, daß beim proteolytischen Abbau von (^{14}C)Palmityl-FSS mit Trypsin radioaktive Peptide freigesetzt werden. Die Intensität der Banden nimmt mit Dauer der Inkubation zu. Die Verteilung der Banden ändert sich nicht.

In dem verwendeten Lösungsmittelsystem hat Palmityl-CoA den R_f -Wert 0.28 und Palmitinsäure den R_f -Wert 1.00. Abb. 8 zeigt deutlich, daß bereits nach vier Stunden Palmitinsäure aus den Thioesterbindungen freigesetzt wird (Ziegenhorn (24) konnte bei der tryptischen Spaltung von (^{14}C)Acetyl-O-Serin-FSS keine radioaktive Essigsäure nachweisen). Weitere Untersuchungen ergaben, daß die Hauptmenge der radioaktiven Peptide bereits nach einer Trypsineinwirkung von 7 Stunden in eine lösliche Form überführt wird und somit jede Ausdehnung der Inkubationszeit in erster Linie die Freisetzung weiterer Palmitinsäure und daher eine Verringerung der Ausbeute zur Folge hat. Als optimale Reaktionsbedingung für die tryptische Spaltung wurde daher die Inkubationszeit von 7 h bei pH 6.80-6.90 und 37°C (15 % Trypsin) gewählt. Eine Nachspaltung des Rückstands dieses Ansatzes ergab nur noch 10 % der anfänglichen Peptidausbeute.

Die Aufarbeitung eines Spaltansatzes geschah wie folgt (genaue Beschreibung im experimentellen Teil S.67): Die nach 7 Stunden immer noch trübe Suspension von (^{14}C)Palmityl-FSS wurde zentrifugiert. Der Überstand enthielt neben großen Mengen wasserlöslichen Peptidmaterials nur maximal 10 % der eingesetzten Radioaktivität. Die dünnschichtchromatographische Prüfung ergab, daß es sich hierbei um freies Palmityl-CoA handelte. Der Rückstand der Spaltung (15-20 % der eingesetzten Proteinmenge) wurde mit H_2O mehrmals gewaschen und getrocknet. Dann wurden die Palmitylpeptide mit Lsgm. A (Butanol/ H_2O -Oberphase, 1 % Eisessig) extrahiert. Aus 100 mg (^{14}C)Palmityl-FSS wurde so radioaktives Material entsprechend 70 nMol (^{14}C)Palmitinsäure gewonnen. Nach diesem Extraktionsschritt waren im Rückstand der tryptischen Spaltung keine Palmitylpeptide mehr nachweisbar: Eine in Ameisensäure gelöste und in Laufmittel B chromatographierte Probe zeigte nach Autoradiographie nur eine radioaktive Bande auf der Startlinie.

Die beschriebenen Versuche zeigen:

- a) Bei der Spaltung von (^{14}C)Palmityl-FSS mit der Protease Trypsin entstehen wasserlösliche, nicht radioaktive Peptide sowie nicht wasserlösliche, lipophile (^{14}C)Palmitylpeptide.

- b) Radioaktive und nicht radioaktive Peptide können auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeitseigenschaften durch Extraktion mit H_2O bzw. Butanol sehr wirkungsvoll voneinander getrennt werden.
- c) 10-20 % des eingesetzten Proteins sind durch Trypsin nicht in eine lösliche Form überführbar. Es ist anzunehmen, daß es sich bei diesem Rückstand um nicht gespaltenes Protein, sowie um unlösliche große Bruchstücke handelt. Die Aufarbeitung dieses Rückstands wird in Kap. IX, S.51 beschrieben.

Ein Aliquot des Butanolextrakts, welcher die Palmitylpeptide enthielt, wurde der Papierelektrophorese bei pH 6.5 (26,27) unterworfen, um Aufschluß über die Reinheit des gewonnenen Materials zu gewinnen (Ausführung des Versuchs vgl. S.67). Abb. 9 zeigt das Ergebnis.

Wie auf Grund ihrer oben geschilderten Löslichkeitseigenschaften zu erwarten ist, wandern die Palmitylpeptide im wässrigen Puffersystem der Papierelektrophorese nicht. Alle Radioaktivität ist auf der Fluorescamin-positiven Startzone (Erläuterung s.S.68) lokalisiert. Die Präparation ist noch mit nicht radioaktiven Peptiden verunreinigt, wie der Vergleich mit einer sauberen Präparation deutlich zeigt (zur weiteren Reinigung vgl. die folgenden Kapitel). Die Abbildung zeigt ferner, daß die Papierelektrophorese eine geeignete Methode ist, um die Reinheit von Palmitylpeptid-Präparationen zu prüfen. Ziel aller weiteren Anreicherungsschritte war es, unter den auf S. 67 beschriebenen Elektrophoresebedingungen nur eine einzige Fluorescamin-positive und zugleich radioaktive Bande zu erhalten. Der Versuch, die Palmitylpeptide mit diversen Lösungsmitteln vom Papier zu eluieren, war erfolglos. Papierelektrophorese und -chromatographie kamen daher nur als analytische Methoden in Betracht.

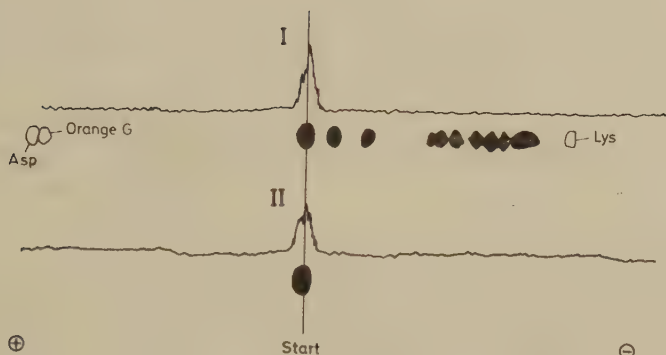


Abb. 9: Papierelektrophorese (pH 6.5) von (^{14}C)Palmitylpeptiden

I Butanolextrakt des Rückstands der tryptischen Spaltung

II saubere Palmitylpeptidpräparation (hierzu s. Kap. V, 2)

Papier: Whatman 3 MM, 46 x 110 cm, Laufzeit: 1.5 h bei 5500 V

Nachweis der Peptide: Fluorescamin-Fluoreszenz (vgl. S.68) bzw. Vermessung der Radioaktivität im Papierstreifenzähler.

2. Trennung von Palmitylpeptiden und wasserlöslichen Peptiden

Die weitere Anreicherung des ACP-Peptids mußte in zwei Schritten erfolgen: Zum ersten die völlige Trennung der Palmitylpeptide von wasserlöslichen Peptiden, zum zweiten die Auftrennung des Palmitylpeptidgemisches in die einzelnen Komponenten, ihre Identifizierung und Charakterisierung. Es schien sinnvoll, den Trennungsgang in der angegebenen Reihenfolge durchzuführen, da im umgekehrten Fall jedes einzelne Palmitylpeptid von Verunreinigungen befreit werden müßte.

Als nächster Reinigungsschritt bot sich die von Ayling (14) angewendete Verteilungschromatographie an. Hierzu wird Sephadex G 50 in der wässrigen Phase eines Butanol/ H_2O -Gemisches gequollen, in die Säule gefüllt und dann mit der organischen Phase äquilibriert. Die tryptischen Palmitylpeptide wurden in wenig Lsgm. A gelöst aufgetragen (experimentelle Einzelheiten s. S. 69). Ihre Elution erfolgte mit der organischen Phase, wie in Abb. 10 gezeigt wird.

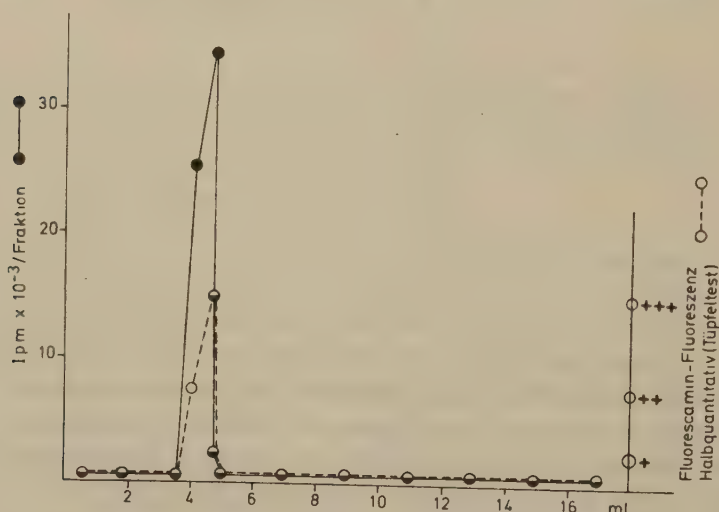


Abb. 10: Phasen-Verteilungschromatographie von (^{14}C)Palmitylpeptiden an Sephadex G 50 nach Lit (14).

Säule 0.6 x 30 cm; Durchfluß: 2.7 ml/h; Fraktionsvolumen 0.6 ml; Probe: 27 nMol Palmitylpeptide in 0.2 ml organischer Phase

Stationäre Phase: Butanol/ H_2O Unterphase, 1 % Eisessig
fließende Phase: Butanol/ H_2O Oberphase, 1 % Eisessig

Ausbeute: 80-90 %.

Es ist ersichtlich, daß 70-80 % der zur Chromatographie eingesetzten Radioaktivität im Eluat wiedergefunden wird. Radioaktive und Fluorescamin-positive Fraktionen sind identisch. Der Verlust an Radioaktivität ist nicht auf den Verlust einer Komponente zurückzuführen: Eingesetztes und eluiertes Material wurden dünnschichtchromatisch verglichen und hierbei in identische Banden aufgetrennt. In einer Vielzahl von Fällen waren die eluierten Palmitylpeptide nach den in Kap. V, 1 S.18 beschriebenen Kriterien (Papiererelektrophorese) sauber. Dennoch schien es nötig, eine weitere Methode zur Abtrennung von Verunreinigungen zu entwickeln.

Zielsetzung war, die Palmitylpeptide nicht mit dem Ausschlußvolumen zu eluieren, sondern sie an einem Träger zu absorbieren und mit Hilfe eines Gradienten von den wasserlöslichen Peptiden getrennt zu eluieren. Ein geeignetes Trägermaterial für diese Methode schien Sephadex LH 20 zu sein, ein lipophiles Derivat von Sephadex G 25, welches sowohl in wässrigen wie auch in organischen Lösungsmitteln gute Quelleigenschaften besitzt (28). Sephadex LH 20 wurde in wässrigem Puffer gequollen und in die Säule gefüllt. Die Palmitylpeptide wurden, in wenig Lsgm. A gelöst, aufgesetzt und die Elution mit dem 4-fachen Ausschlußvolumen an wässrigem Puffer begonnen. Experimentelle Einzelheiten werden auf S. 69 erläutert. Abb. 11 zeigt ein typisches Elutionsdiagramm.

Es ist ersichtlich, daß mit der wässrigen Phase Fluorescamin-positives Material eluiert wird, jedoch keine Radioaktivität. Die Elution der Palmitylpeptide erfolgte anschließend mit einem linearen Gradienten: Der wässrigen Phase wurden steigende Mengen Propanol zugesetzt. Mit 80 %igem Propanol wurde 70-80 % der eingesetzten Radioaktivität eluiert. Die Anwendung eines linearen Gradienten ermöglichte eine wiederholte Verwendung der Säule. Bei Anwendung eines Stufengradienten (H_2O /Butanol oder H_2O /Propanol) riß das Gelbett und war nicht weiter verwendbar.

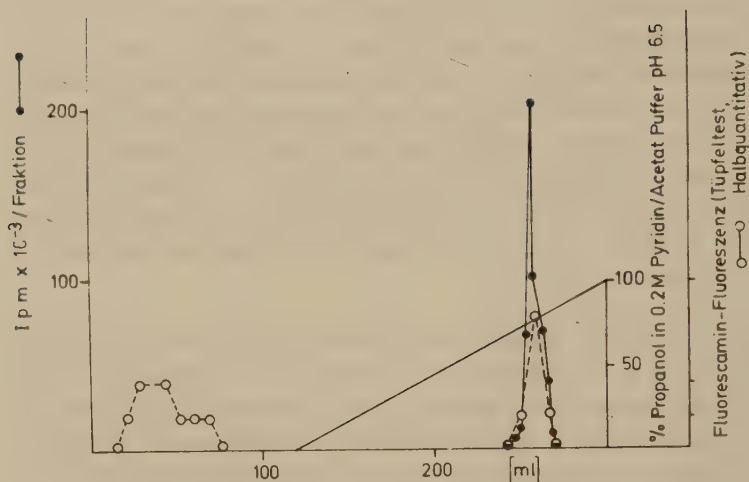


Abb. 11: Säulenchromatographie von (^{14}C)Palmitylpeptiden an Sephadex LH 20

Säule: 1,6 x 55 cm; V_0 = 18 ml; Durchfluß: 24 bzw. 6 ml/h; Fraktionsvolumen 1,8 - 4,4 ml; Probe: 37 nMol Palmitylpeptide in 0,5 ml Lsgm. A (vgl. S. 63); Ausbeute 60-70 %; Elutionsmittel: 0.2 M Pyridin/Acetat-Puffer pH 6.5; Gradient: Mischgefäß 80 ml Puffer, Vorratsgefäß 100 ml Propanol.

Nach den beschriebenen säulenchromatographischen Reinigungsschritten lagen die Palmitylpeptide frei von Verunreinigungen vor, wie durch Papierelektrophorese bei pH 6.5 leicht nachgewiesen werden konnte. Als nächste Aufgabe stellte sich daher: Die Auftrennung des Gemisches von Palmitylpeptiden in die einzelnen Komponenten.

3. Auftrennung der Palmitylpeptide

In Anlehnung an die Arbeiten von Ayling (14) bot sich für die Auftrennung der Palmitylpeptide die präparative Dünnschichtchromatographie an. Diese Methode hat entscheidende Nachteile: Sie ist umständlich in der Handhabung und hat eine geringe Trennkapazität; zudem besteht die große Gefahr, daß die Probe durch freie Aminosäuren oder Peptide verunreinigt wird, welche in der Trägerschicht enthalten sind. Es wurden daher Versuche unternommen, die Palmitylpeptide unter Anwendung von Säulenchromatographie zu trennen. Alle Ansätze dieser Art schlugen jedoch fehl, da die Palmitylpeptide fast immer gemeinsam eluiert wurden. Tab. 1 gibt einen Überblick über einige der versuchten Säulenschritte. Es ist ersichtlich, daß bei keiner Methode mehr als 2 radioaktive Gipfel eluiert wurden. Einer von diesen ist wahrscheinlich jeweils freier Palmitinsäure zuzuschreiben. Da das Ziel, eine Auftrennung aller Komponenten, nicht erreicht wurde, schien es unnötig, die eluierten radioaktiven Fraktionen genauer zu untersuchen.

Als einzige Alternative bot sich die präparative Dünnschichtchromatographie an. Die Wahl der Kieselgelschicht bereitete Schwierigkeiten, da alle gängigen käuflichen Dünnschichtplatten, wie sie bislang für analytische Zwecke verwendet worden waren, Protein im Bindemittel enthalten. Selbsthergestellte Schichten waren frei von Verunreinigungen, wiesen aber schlechtere Trenneigenschaften auf (größere Bandenbreiten, schlecht reproduzierbare R_f -Werte). Zudem waren sie sehr empfindlich gegenüber mechanischen Verletzungen und daher weniger gut geeignet für die Anwendung der Autoradiographie. Optimales Arbeiten war nur möglich mit Dünnschichtplatten der Firma Analchem (Luton, England). Diese enthalten Gips als Bindemittel und zeichnen sich durch eine sehr stabile Oberfläche aus.

Tab. 1: Übersicht über einige Versuche zur säulenchromatographischen Auftrennung der Palmitylpeptide. Die Vorbehandlung der Trägermaterialien erfolgte im jeweils ersten Elutionsmittel

Trägermaterial	Elutionsmittel	Ausbeute %	Zahl der radioakt. Gipfel im Eluat
Kieselgelfertigsäule (Merck)	LSGm. B ⁺)	30	2
Kieselgel, silanisiert (Merck)	Chloroform, Gradient Chloroform- Methanol (5% H ₂ O)	60	2
Molekularsieb OR-PVA-5000 (Merck)	90 % Propanol in H ₂ O	71	1
Sephadex G 50	50 % Eisessig	58	1
Biogel P ₂ (Biorad)	50 % Eisessig	50	1
Ionenaustauscher (DE-52(Acetat-Form) (Whatman)	Propanol steigende Mengen Eisessig in Propanol Lit (29)	23	2

+) Zusammensetzung der Lösungsmittel s.S. 63 .

Die aus 100 mg (^{14}C)Palmityl-FSS angereicherten, sauberen Palmitylpeptide wurden auf jeweils eine Platte von der Schichtdicke 0.25 mm aufgetragen. Als Laufmittel diente Lsgm. B. Die Lage der radioaktiven Banden wurde durch Autoradiographie ermittelt. Die Elution der Peptide erfolgte, wie im experimentellen Teil (S. 70) beschrieben. Abb. 12 zeigt eine Auftrennung der Peptide T_1 - T_6 . Peptid T_7 war nur zu geringem Anteil vertreten, daher oft schwer zu lokalisieren und zudem häufig mit Palmitinsäure verschmiert (Überladungseffekt). Abb. 13 zeigt die Peptide T_1 - T_7 auf einer präparativen Dünnschichtplatte, welche

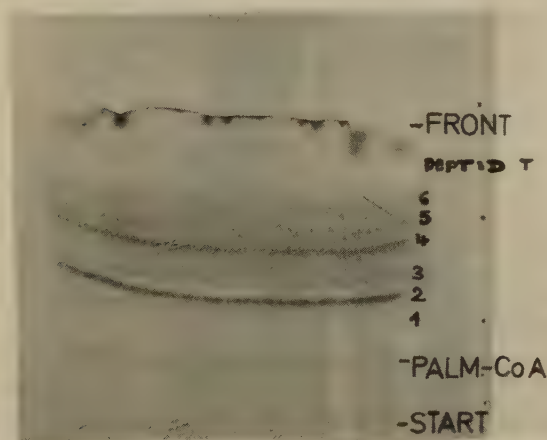


Abb. 12: Präparative Dünnschichtchromatographie von tryptischen (^{14}C)Palmitylpeptiden aus (^{14}C)Palmityl-FSS.

Probe: 60 nMol radioaktives Material
Kieselgel (0.25 mm), Laufmittel: Phenol:Butanol: H_2O :Eisessig = 2:2:1:1, Laufzeit 4.5 h. Peptid T_7 auf photographischer Abbildung des Autoradiogramms nicht erkennbar. Hierzu s.S. 26 Abb. 13.

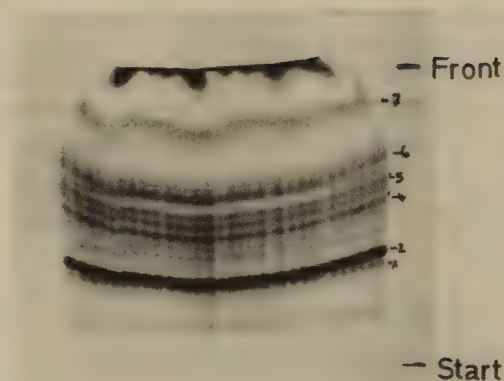


Abb. 13: Analog Abb. 12.

Probe: 80 nMol radioaktives Material
Belichtungszeit im Vergleich zu Abb. 12 verdoppelt.
Tryptisches Peptid T_7 abgetrennt.

hinsichtlich T_1 - T_6 überladen ist. Das Auftreten zusätzlicher (schwacher) Banden ist Folge der in diesem Fall wesentlich längeren Belichtungszeit und demonstriert die große Zahl von wahrscheinlich unspezifischen Nebenprodukten der tryptischen Spaltung. Abb. 13 erklärt somit, warum die Peptide T_3 - T_6 nicht in sauberer Form von der Dünnschichtplatte eluiert werden konnten (vgl. Tab. 2, S. 36, Eigenschaften der isolierten Peptide). Die Peptide T_1 , T_2 und T_7 waren hingegen durch die Aminosäureanalyse gut charakterisierbar (vgl. Tab. 3, S. 37). Die Mengenverhältnisse der Peptide T_1 - T_7 nach Elution von der Dünnschichtplatte sind in Abb. 14 dargestellt. Dem Diagramm kann entnommen werden, daß Peptid T_2 die Hauptkomponente darstellt.

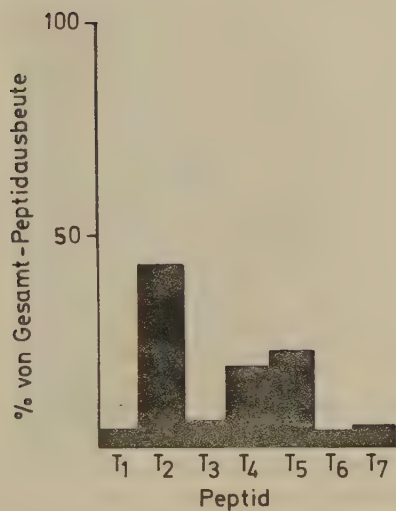
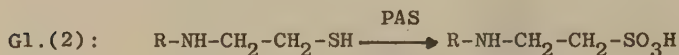


Abb. 14: Prozentualer Anteil der Peptide T₁ - T₇ an der Gesamt-Peptidausbeute nach Elution von präparativen Dünnschichtplatten. Dem Diagramm liegen die Mittelwerte aus mehreren Präparationen zugrunde.

VI. Unterscheidung von Sauerstoffestern und Thioestern

Nach einer von Sanger (30) eingeführten Methode können schwefelhaltige Aminosäuren (z.B. Cystein, Methionin) durch Oxydation mit Perameisensäure (PAS) in stabile Derivate überführt werden (Cysteinsäure bzw. Methioninsulfon). Diese Modifizierungsreaktion wird bei der Aminosäureanalyse von Proteinen und Peptiden ausgenutzt. Cystein z.B. wird unter den Bedingungen der salzsäuren Hydrolyse fast völlig zerstört. Seine vorherige Überführung in Cysteinsäure ermöglicht dagegen eine quantitative Bestimmung.

Das in der vorliegenden Arbeit zu untersuchende ACP-Peptid enthält Palmitinsäure in einer thioesterartigen Bindung an Cysteamin, welches ebenfalls nach salzsaurer Hydrolyse nicht bestimmt werden kann. Gemäß Gl. 2 kann es jedoch durch PAS-Oxydation in das stabile Taurin überführt werden (31).



R = Peptid-phosphopantothensäure

Wie auf S.6 erläutert, ist zu erwarten, daß bei der tryptischen Spaltung von (^{14}C)Palmityl-FSS Peptide entstehen, welche Palmitinsäure sowohl in Thioester- als auch in Sauerstoffesterbindung enthalten. Aus dem oben Gesagten geht hervor, daß die Oxydation mit PAS dazu verwendet werden kann, Sauerstoffester und Thioester zu unterscheiden. Es ist zu erwarten, daß das (^{14}C)Palmityl-Serin-Peptid der Palmityltransferase durch PAS nicht modifiziert wird. Aus (^{14}C)Palmitylcystein (kondensierendes Enzym) und (^{14}C)Palmitylcysteamin (ACP) muß hingegen radioaktive Palmitinsäure freigesetzt werden.

Im Experiment wurde daher das Gemisch von Palmitylpeptiden mit PAS behandelt (Ausführung s.S.72) und auf eine analytische Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Entwicklung des Chromatogramms in Laufmittel B geschah analog früheren Versuchen. Abb. 15 zeigt das Ergebnis: Von den isolierten Palmitylpeptiden ist nur ein sehr geringer Prozentsatz PAS-stabil (3-4 %, wie im Dünnschicht-

schicht-Scanner ermittelt). Die im Kontrollversuch mit Ameisensäure analog behandelten Peptide ergaben ein unverändertes Bild (vgl. Abb. 18, S.34).

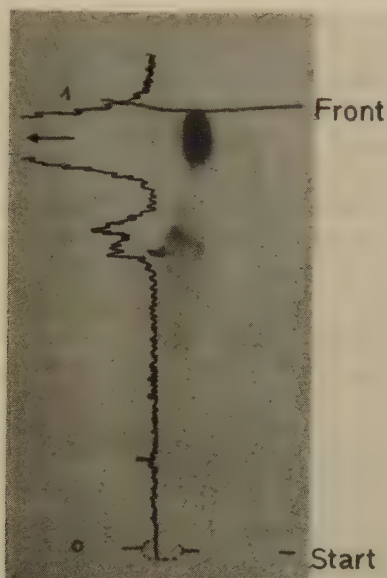


Abb. 15: Dünnschichtchromatographie von PAS-oxidierten (^{14}C)-Palmitylpeptiden. Kontrollversuch (Inkubation in Ameisensäure) vgl. Abb. 18.

Kieselgel (0.25 mm), Laufmittel: Phenol:Butanol: H_2O :Eisessig = 2 : 2 : 1 : 1, Laufzeit 4 h.

Über die Lage der radioaktiven Banden kann jedoch nach diesem Versuch nichts Endgültiges gesagt werden: Es wäre denkbar, daß sich durch die PAS-Oxydation die Wanderungseigenschaften eines Peptids stark verändern (Modifizierung von Cystein, Methionin, Zerstörung von Tryptophan). Der Versuch mußte daher auf eine andere Weise wiederholt werden.

Hierzu wurden die Peptide T_1 - T_7 von einer präparativen Dünnschichtplatte eluiert. Von jedem Peptid wurde je ein Aliquot mit Ameisensäure bzw. PAS inkubiert und anschließend auf eine analytische

Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Entwicklung des Chromatogramms in dem Laufmittel Äther : Petroläther : Eisessig = 5:4:1 trennte leicht freie (^{14}C)Palmitinsäure ($R_f = 1$) von PAS-stabilem (^{14}C)Palmitylpeptid ($R_f = 0$).

Abb. 16 zeigt ein solches Chromatogramm für die Peptide T_1 , T_3 und T_6 . Die Kontrollinkubationen in Ameisensäure setzten keine nennenswerten Mengen Palmitinsäure frei. Alle radioaktiven Banden wurden von der Dünnschichtplatte abgekratzt, in Szintillationsgläschen überführt und mit Toluol Carbosil (32) emulgiert. Dann wurde die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt (bezüglich Details und Eichung der Methode s.S. 71).

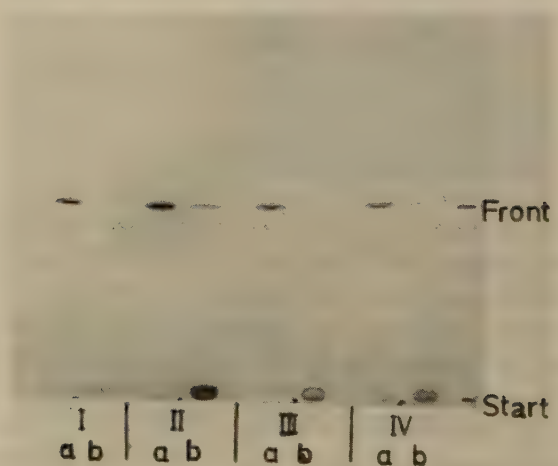


Abb. 16: Dünnschichtchromatographie von Palmitylpeptiden nach PAS-Oxydation (a), sowie nach Kontrollinkubation in Ameisensäure (b), Abtrennung von freier Palmitinsäure ($R_f = 1$).

I: (^{14}C)Palmityl-CoA II: Peptid T_1 III: T_3 IV: T_6
Kieselgel (0.25 mm), Laufmittel: Äther:Petroläther:Eisessig = 5 : 4 : 1, Laufzeit 20 min.

Aus den erhaltenen Werten wurde errechnet, zu welchem Prozentsatz die einzelnen Peptide Palmitinsäure in Sauerstoffesterbindung enthielten. Vergleichssubstanz war (^{14}C)Palmityl-CoA, welches durch PAS-Oxydation zu 98 % in freie (^{14}C)Palmitinsäure überführt wird. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 2, S. 36 aufgeführt und liefern in Ergänzung zur Aminosäureanalyse wertvolle Information bezüglich der Sauberkeit der einzelnen Peptide (s. Diskussion S. 47). Im voraus sei erwähnt, daß die Peptide T_5 , T_6 und T_7 mit PAS-stabilem Material verunreinigt waren, wie schon der Vergleich von Abb. 13 und Abb. 15 vermuten läßt.

Aus den erwähnten Ergebnissen geht hervor, daß von den angereicherten Palmitylpeptiden nur ein kleiner Prozentsatz (3-4 %) aus der Palmityltransferase stammten. Die Transferasepeptide sind zudem von der präparativen Dünnschichtplatte nicht in reiner Form isolierbar. Dieser Befund wäre auf zweierlei Weise erklärbar:

- 1) Unter den angewendeten Bedingungen (s. S. 66) wird die Palmityltransferase nicht mit (^{14}C)Palmitat beladen.
- 2) Das Transferasenpeptid befindet sich im Rückstand der tryptischen Spaltung. Es wird entweder aus (^{14}C)Palmityl-FSS durch Trypsin nicht freigesetzt oder das gebildete Bruchstück ist auf Grund seiner Größe unlöslich in Wasser bzw. Butanol.

Erklärung 1) schien unwahrscheinlich, da Ayling (14) nach peptischer Spaltung PAS-stabile Peptide in guter Ausbeute isolieren konnte. Um Punkt 2) zu prüfen, wurde je ein Aliquot des bereits eluierten Rückstands der tryptischen Spaltung (vgl. S. 15) mit Ameisensäure bzw. PAS behandelt und in Lsgm. B chromatographiert. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt. Die Ermittlung der Intensitäten der radioaktiven Banden im Dünnschichtscanner ergab folgendes Bild:

1. Der Rückstand der Elution besteht zu 50 % aus freiem Palmityl-CoA (Abb. 17, I)
2. Die Gesamtmenge des Rückstands besteht zu 20 % aus PAS-stabilem Material (Abb. 17, II).

Hieraus kann gefolgert werden, daß 40 % der kovalent proteingebundenen Palmitinsäure in einer Sauerstoffesterbindung vor-

liegt. Offensichtlich setzt Trypsin aus (^{14}C)Palmityl-FSS kein mit den beschriebenen Methoden extrahierbares Peptid in größerer Menge frei. Die Isolierung des Transferasenpeptids aus dem Rückstand der tryptischen Spaltung wird in Kap. IX, beschrieben.

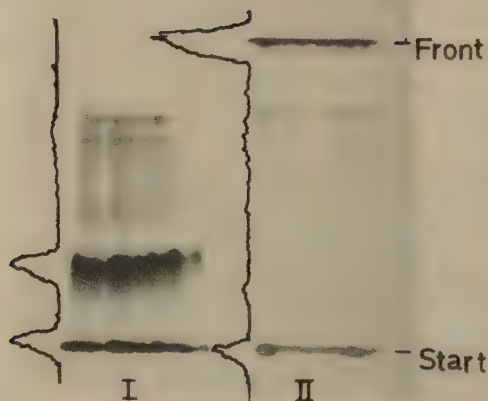


Abb. 17: Dünnschichtchromatographie des eluierten Rückstands der tryptischen Spaltung.

I : nach Ameisensäure-Behandlung

II : nach PAS-Oxydation

Kieselgel (0,25 mm), Laufmittel: Phenol:Butanol:H₂O:Eisessig = 2 : 2 : 1 : 1, Laufzeit 4 h.

VII. BELADUNG VON FSS MIT IODACETAMID UND (1-¹⁴C)PALMITYL-CoA

Inkubation von FSS mit Jodacetamid (JAA) resultiert in einem 100 %igen Verlust der enzymatischen Gesamtaktivität. Versuche von Hagen (18) und Oesterheld (19) haben gezeigt, daß die Inaktivierung auf der Alkylierung der Aminosäure Cystein im aktiven Zentrum des kondensierenden Enzyms beruht. Unter geeigneten Bedingungen (19) gelingt es, nur den Cysteinrest des kondensierenden Enzyms zu alkylieren. So gelang Oesterheld (19) und Kresze (33) die Isolierung von 2(¹⁴C)Carboxyamidomethylcystein-peptiden aus dem aktiven Zentrum dieser Enzymfunktion. Die Substratbindungsstelle des ACP, Cysteamin, reagiert unter den gewählten Bedingungen nicht mit JAA. Nach Totalhydrolyse des JAA-inaktivierten Enzyms ist nur Carboxyamidomethyl-Cystein, dagegen kein Carboxyamidomethyl-Cysteamin nachweisbar (18).

Aus diesen Befunden zog Ayling (14) den Schluß, daß es möglich sein müsse, durch Vorinkubation von FSS mit JAA eine Beladung des kondensierenden Enzyms mit (¹⁴C)Palmityl-CoA zu verhindern. Beim Vergleich entsprechender Peptidpräparationen fand sie im Fall von JAA-vorinkubierter FSS eine Bande weniger. Sie schrieb diese Bande einem Peptid aus dem aktiven Zentrum des kondensierenden Enzyms zu. Eine Charakterisierung dieses Peptids (stöchiometrischer Gehalt von Cystein?) erfolgte nicht.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde FSS mit JAA vorinkubiert. Nach darauffolgender Beladung mit (¹⁴C)Palmityl-CoA, tryptischer Spaltung und Aufarbeitung der Palmitylpeptide (wie in Kap. V beschrieben) wurden diese der analytischen Dünnschichtchromatographie in Lsgm. B unterworfen. Hierbei konnten die Ergebnisse von Ayling nicht bestätigt werden. Abb. 18 zeigt den Vergleich zweier Präparationen aus FSS (Palmitat-beladen) und FSS (JAA/Palmitat-beladen).

Beide Proben wurden PAS oxydiert bzw. zur Kontrolle analog mit Ameisensäure behandelt. Offensichtlich wird die Bildung keines der (¹⁴C)Palmitylpeptide durch Vorinkubation der FSS mit JAA wesentlich verhindert. Es kann im Gegenteil ein verstärktes Auftreten einiger Banden ($R_f = 0.27, 0.76$) beobachtet werden.

Interessanterweise ist nach JAA-Vorinkubation ein verstärktes Auftreten von PAS-stabilen Peptiden zu erkennen (Abb. 18, 2b).

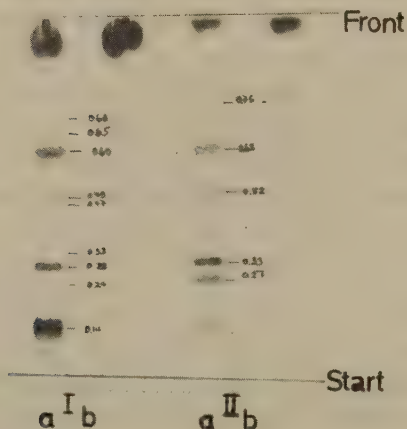


Abb. 18: Dünnschichtchromatographie von (^{14}C)Palmitylpeptiden aus (^{14}C)-FSS. Nach Ameisensäurebehandlung (a) nach PAS Oxydation (b). Die Peptide wurden angereichert nach I : Inkubation von FSS mit (^{14}C)Palmityl-CoA
II : Inkubation von FSS mit 1.) JAA 2.) (^{14}C)Palmityl-CoA
Kieselgel (0,25 mm), Laufmittel: Phenol:Butanol: H_2O : Eisessig = 2 : 2 : 1 : 1, Laufzeit 4-5 h.
Anmerkung zu I b: PAS-stabile Palmitylpeptide nicht erkennbar (nur 3-4 % der Gesamtradioaktivität). Hierzu s. Abb. 15, S 29).

Ohne weitere und umfassendere Untersuchungen kann dieses Ergebnis nicht gedeutet werden. Für die Unterscheidung von Peptiden aus kondensierendem Enzym bzw. ACP schien uns diese Methode nicht geeignet zu sein. Da diese Unterscheidung mit Hilfe der Aminosäureanalyse leicht möglich war, wurden die geschilderten Versuche nicht weitergeführt.

VIII. CHARAKTERISIERUNG DER TRYPTISCHEN PALMITYLPEPTIDE T₁-T₇

1. Übersicht

Die Tabellen (2) und (3) geben eine Übersicht über die untersuchten Eigenschaften der von präparativen Dünnschichtplatten eluierten tryptischen Peptide. Aus Tab. 2 kann entnommen werden:

- a) T₁-T₄ sind ACP-Peptide
- b) T₅ ist ein Gemisch mehrerer Peptide
- c) T₆ und T₇ stammen aus dem aktiven Zentrum des kondensierenden Enzyms.

Saubere Aminosäureanalysen konnten nur von T₁, T₂ und T₇ erhalten werden. Ihre Aminosäurezusammensetzung ist in Tab. 3 wiedergegeben. Die Analysen der übrigen Peptide machten keine Aussage über ihre Zusammensetzung möglich. Weitere Reinigungsschritte wurden nicht unternommen. Im Fall von Peptid T₇ waren 10.4 % PAS-stabiler Verunreinigung (vgl. S. 28) korrelierbar mit 10 % Verunreinigung in der Aminosäureanalyse. Nach entsprechender Korrektur ergaben sich vernünftige ganzzahlige Werte. Eine ausführliche Diskussion aller Ergebnisse wird auf S. 47 gegeben.

Peptid T₂ schien von Reinheitsgrad und Ausbeute her am geeignetsten, um die Sequenz des ACP in der Umgebung des 4'-Phosphopantetheins aufzuklären.

Tab. 2: Zusammenstellung der untersuchten Eigenschaften der tryptischen (¹⁴C)Palmityl-peptide T₁ - T₇ von FSS aus Hefe.

Peptid	Stöchiometrischer Gehalt an Cysteamin bzw. Cystein ⁺)	prozent. Anteil an Peptid- ausbeute	%PAS-stabile Esterbindung ++)	Zahl der Aminosäuren (errechn. Mol.Gew. abger.)	Herkunft (vgl. Diskussion)
T ₁	+	4.5	0.3	24 (3400)	ACP
T ₂	+	43.3	0.2	13 (2000)	ACP
T ₃	+	5.5	0.5	nicht sauber	ACP
T ₄	+	19.4	nicht ausgewertet	nicht sauber	ACP
T ₅	-	23.5	11.8	nicht sauber	Gemisch, keine Aussage möglich
T ₆	-	3.6	30.2	nicht sauber	Kondens. Enzym
T ₇	-	3.2	10.4	28 (3500)	Kondensierendes Enzym

+) Bestimmt als Taurin bzw. Cysteinsäure nach PAS-Oxydation

++) Versuchsbeschreibung vgl. S. 28 und S.72 .

Tab. 3: Aminosäureanalyse der (^{14}C)Palmitylpeptide T_1 , T_2
und T_7

Alle Zahlenangaben: nMol Aminosäure pro nMol Peptid. In Klammern die Zahl der angenommenen Reste pro Peptidmolekül.

Aminosäure	a) T_1	b) T_2	c) T_3
Tau	0.97 (1)	1.09 (1)	-
Asp	2.08 (2)	2.04 (2)	1.00 (1)
Thr (nicht korr.)	1.56 (2)	0.87 (1)	-
Ser " "	1.90 (2)	0.65 (1)	1.65 (2)
Glu	4.90 (5)	2.12 (2)	0.90 (1)
Pro	-	-	4.61 (5)
Gly	2.07 (2)	1.97 (2)	2.90 (3)
Ala	2.09 (2)	-	2.10 (2)
Cys (als CySSO_3H)	-	-	0.92 (1)
Val	1.93 (2)	1.00 (1)	4.07 (4)
Met (als MetSO_2)	-	-	-
Ile	0.96 (1)	0.87 (1)	2.88 (3)
Leu	4.07 (4)	1.94 (2)	1.98 (2)
Tyr	-	-	-
β -Ala	~ 1 (d)	1.02 (1)	-
Phe	0.80 (1)	-	3.00 (3)
Lys	1 (c)	1.34 (1)	nicht aus- gewertet c)
His	-	-	-
Arg	-	-	-

a) nach PAS-Oxydation.

b) Werte nach PAS-Oxydation von T_2 ! Analyse ohne vorherige Oxydation ergab dieselbe Zusammensetzung.

c) Lys teilweise mit NH_3 gemeinsam eluiert. Auswertung nur grob oder gar nicht möglich.

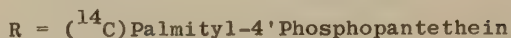
d) β -Ala färbt schwach an. Nur qualitative Auswertung möglich.

Experimentelle Einzelheiten zur Durchführung der Aminosäureanalysen s. S. 72.

2. Charakterisierung von ACP-Peptid T₂

a) Endgruppenbestimmung

Die Aminosäureanalyse (Tab. 3) charakterisierte T₂ als ein Peptid der folgenden Zusammensetzung:



Auf Grund der Spezifität der tryptischen Spaltung kann angenommen werden, daß Lysin die C-terminale Aminosäure ist. Das Verhältnis (¹⁴C)Palmitinsäure : Tau : β Ala betrug 1:1:1, wie von einem ACP-Peptid zu fordern ist.

Um neben der Aminosäureanalyse ein weiteres Reinheitskriterium zu haben, wurde eine Endgruppenbestimmung mit Dimethylaminonaphthalinsulfonylchlorid (Dansyl-Chlorid) versucht (34,35). Hierbei wird die N-terminale Aminosäure mit Dansylchlorid umgesetzt. Nach salzsaurer Hydrolyse des Peptids kann ihr Dansylderivat in der Dünnschichtchromatographie auf Polyamidplättchen (34,35) identifiziert werden (ausführliche Versuchsbeschreibung s.S. 73). Um eine Störung der Reaktion durch schlechte Löslichkeit des Palmitylpeptids auszuschließen, wurden Endgruppenbestimmungen mit PAS-oxydiertem, NH₃-behandeltem und nicht modifiziertem Peptid unternommen. In keinem Fall wurde jedoch eine eindeutige Endgruppe gefunden. Ein schwacher Hintergrund von diversen Dansyl-Aminosäuren wurde auf geringe Verunreinigungen zurückgeführt.

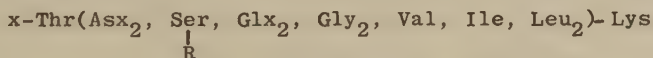
Im Folgenden sei aufgezählt, welche Umstände dieses Ergebnis erklären könnten und welche Methoden zur Aufklärung des Problems beitrugen.

Möglichkeit 1: Die N-terminale Dansyl-Aminosäure ist hydrolyseempfindlich oder sie wird nur langsam aus dem Peptid freigesetzt. Gegen diese Erklärung sprach, daß auch bei Verkürzung und Verlängerung der Hydrolysezeiten (6-20 h) kein Ergebnis erhalten wurde.

Möglichkeit 2: N-Terminus des Peptids ist Tryptophan. Dieses konnte auf Grund seiner Labilität unter den Hydrolysebedingungen weder in der Aminosäureanalyse noch als Dansylderivat nachgewiesen werden.

Das Fluoreszenzspektrum des Peptids in Lsgm. E (Methanol : H₂O : Eisessig = 5 : 2 : 1) und Vergleich mit einer Tryptophan-Standardlösung ($\lambda_{\text{abs}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 338 \text{ nm}$ (36)) bewies jedoch eindeutig die Abwesenheit von Tryptophan.

Möglichkeit 3: Der N-Terminus ist blockiert. In diesem Fall wäre auch ein Edman-Abbau (37) der N-terminalen Aminosäure unmöglich. Nach einmaliger Umsetzung des PAS-oxidierten Peptids mit PITC, Extraktion der (nicht identifizierbaren!) PTH-Aminosäure und erneuter Endgruppenbestimmung mit Dansylchlorid wurde jedoch eindeutig Threonin gefunden. Nach diesem Befund konnte daher die Struktur des Peptids T₂ wie folgt näher beschrieben werden:



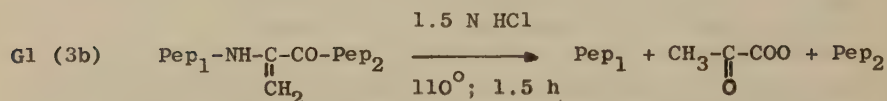
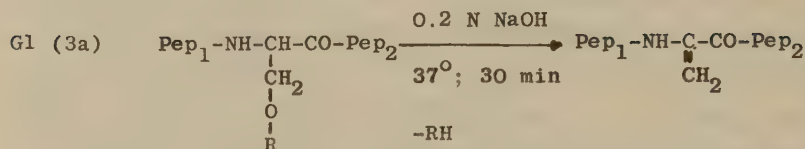
Die einzige noch denkbare Alternative zur Lösung des Problems schien zu sein:

Möglichkeit 4: (¹⁴C)Palmityl-4'-Phosphopantethein-Serin ist die N-terminale Aminosäure. Die folgenden Versuche zeigten, daß diese Annahme richtig war.

b) Serin als Träger des 4'-Phosphopantethein-Rests

Nach Patchornik (38) können Peptide an der Aminosäure Serin gespalten werden, wenn deren Alkoholfunktion mit einer leicht austretenden Gruppe R verestert wird. Unter basischen Bedingungen bildet sich aus dem substituierten Serin unter β -Eliminierung Dehydroalanin. Dieses wird bei Behandlung mit 1.5 N HCl in Pyruvat überführt, gleichzeitig wird der N-Terminus der dem Serin benachbarten Aminosäure freigesetzt.

G1 (3) zeigt den Reaktionsverlauf:



R=Tosyl-, Phosphoryl-

Das entstandene Pyruvat kann durch Umsetzung mit Lactatdehydrogenase (LDH) enzymatisch bestimmt werden. Auf diese Weise wurde in ACP aus *E. coli* Serin als Träger des 4'-Phosphopantetheins nachgewiesen (39). Oesterhelt (19) wies mit Hilfe der Serinspaltung die analoge Funktion dieser Aminosäure in FSS aus Hefe nach. Auch im vorliegenden Fall wurde die Reaktion gemäß Gl. (3) durchgeführt (genaue Versuchsbeschreibung s.S. 74). Nach jedem Schritt wurde ein Aliquot zur Endgruppenbestimmung mit Dansylchlorid entnommen. Die folgende Tab. (4) zeigt das Ergebnis.

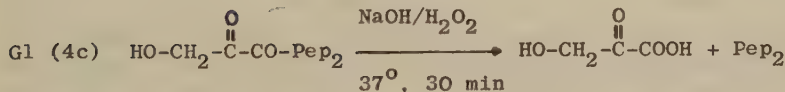
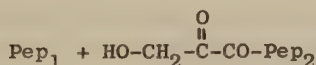
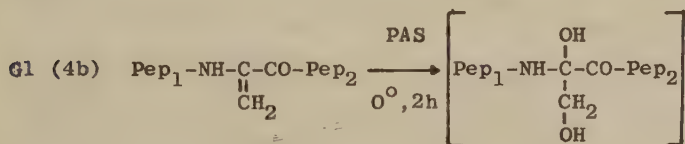
Tab. 4: Nachweis von Serin als Träger des 4'-Phosphopantetheins. Spaltung des Peptids T₂ nach (38) gem. Gl. 3 (s. Text).

Modifizierung des Peptids	Endgruppe (als Dansylamino- säure)	Pyruvat (enzymatisch nachgewiesen)
1) keine	-	-
2) 0.2 N NaOH	-	-
3) 1.5 N HCl	Leu, Gly, Asp, Glu Thr, bis-Dansyl-Lys	+

Aus Tab. 4 geht hervor, daß das Serin in Peptid T₂ den 4'-Phosphopantetheinrest trägt (Nachweis von Pyruvat). Die Endgruppe des neu entstandenen Peptids 2 konnte jedoch nicht identifiziert werden, da offensichtlich durch Einwirkung von 1.5 N HCl bei 110° C weitere Peptidbindungen hydrolysiert werden (hierzu vgl. auch (38)). Unter anderem wurde auch - vermutlich C-terminales - Lysin als bis-Dansyl-Lys gefunden. Um den neu entstehenden N-terminus von Pep₂ zu identifizieren, mußten daher mildere Spaltungsbedingungen angewendet werden. Hier bot sich die Methode von Carpenter an (40).

Gl. 4 zeigt, wie durch Oxydation des Dehydroalanins mit PAS und anschließende Behandlung mit alkalischem H₂O₂ Hydroxypyruvat und 2 Spaltpeptide entstehen.

Gl (4a) wie Gl (3a)



Die Ausführung des Versuchs ist auf S. 74 beschrieben. Das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle 5:

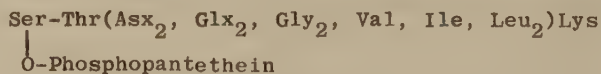
Tab. 5: Serinspaltung des Palmitylpeptids T_2 nach (40).
Nachweis von Thr als neuem N-Terminus. Durchführung der Reaktion vgl. Gl. (4) sowie Text S. 74.

Modifizierung des Peptids	Endgruppe (Dansylaminosäure)
keine	-
PAS	-
$H_2O_2/NaOH$	Thr

Alle Versuche zur Endgruppenbestimmung können daher wie folgt zusammengefaßt werden:

- 1) Der N-Terminus von Peptid T_2 ist nicht blockiert. Edman-Abbau liefert eine nicht identifizierbare PTH-Aminosäure und setzt Threonin als neue N-terminale Aminosäure frei.
- 2) Bei Spaltung des Peptids am Serin wird Pyruvat gebildet. Das entstandene Bruchstück Pep_2 (Gl. (3)) hat die Endgruppe Threonin.

Da das Palmitylpeptid T_2 laut Aminosäureanalyse (Tab. 3) nur ein Thr enthält, kann daher als bewiesen angesehen werden, daß Serin (-O-Phosphopantethein) die N-terminale Aminosäure ist. Als Struktur konnte bei diesem Stand der Untersuchungen folgende Zusammensetzung formuliert werden:



c) Sequenz des Peptids T₂

Nach den oben geschilderten Versuchen zur Endgruppenbestimmung war anzunehmen, daß einer Sequenzierung des Peptids mit Hilfe des Edman-Abbaus nichts im Wege stand. Um mit dem wenigen Material, das zur Verfügung stand (60 nMol), die Sequenz eindeutig bestimmen zu können, mußte eine Methode gewählt werden, welche die Identifizierung von PTH-Aminosäuren im Nanomolbereich erlaubt. Dies schien im vorliegenden Fall besonders wichtig, da das Peptid T₂ 2 Glu(NH₂) und 2 Asp (NH₂) enthielt. Asp und Glu können von den entsprechenden Säureamiden direkt nur als PTH-Aminosäuren unterschieden werden (HCl-Hydrolyse der Amidbindung bei Dansylchlorid-Endgruppenbestimmung). Es wurde daher zur Sequenzierung eine Kombination verschiedener Methoden angewendet. Eine ausführliche Beschreibung erfolgt auf S. 75. Eine Verbindung von Edman (37,41)- und 'Dansyl-Edman' (34)-Methode ermöglichte sowohl die eindeutige Identifizierung der PTH-Aminosäuren als auch eine Dansyl-Endgruppenbestimmung nach jedem Edman-Abbau. Die Identifizierung der PTH-Aminosäuren erfolgte nach (42). Hierbei wird die Probe auf Polyamidplättchen in 2 Lösungsmittelsystemen chromatographiert (vgl. experimentellen Teil S. 76). Durch Verwendung des Fluoreszenzindikators Butyl-PBD ist die Identifizierung der PTH-Aminosäuren im Subnanomolbereich möglich. Nicht aufgetrennt werden Leu/Ile und Arg/His. Letztere waren in Peptid T₂ nicht vertreten.

In einem 10 nMol-Ansatz wurden 10-30 %, in einem 50 nMol-Ansatz 2-10 % der PTH-Aminosäuren für die Identifizierung gem. Abb. (19) verwendet (genaue Ausführung s.S. 76). Der Rest wurde der reduktiven Hydrolyse mit HJ unterworfen (43). Hier- nach konnten die entstandenen freien Aminosäuren im Analysator identifiziert werden. Ile kann auf diese Weise leicht von Leu unterschieden werden (Produkt der reduktiven Hydrolyse: Ile + Allo-Ile).

In einem probeweisen Sequenzierungsansatz mit 10 nMol Peptid gelang die eindeutige Bestimmung der ersten 8 Aminosäuren. Rest Nr. 9 (Gly) war nicht mehr identifizierbar. In einem zweiten Ansatz (50 nMol) waren alle PTH-Aminosäuren identifizier-

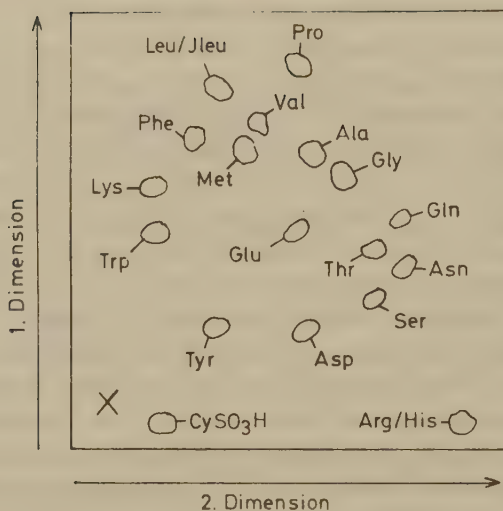


Abb. 19: Auftrennung von PTH-Aminosäuren auf Polyamidfolie (5 x 5 cm) nach (42). Laufmittel:

1. Dimension : Toluol : nPentan : Eisessig = 60 : 30 : 35 (250 mg Butyl-PBD/l).
2. Dimension : 35 % Eisessig
Laufzeiten ca. 10 min. Empfindlichkeit: 0.5 nMol gut erkennbar.

bar. Zusätzlich wurden an kritischen Stellen (Leu/Ile, Gly) Aliquote zur Endgruppenbestimmung entnommen. Nach 12 Abbau-schritten wurde das im Glas verbliebene Material mit Dansyl-chlorid umgesetzt und ohne vorherige HCl-Hydrolyse nach (35) chromatographiert. Auf diese Weise wurde ϵ -PTC-Lysin als C-terminale Aminosäure gefunden. Tab. 6 faßt die Ergebnisse zusammen. Die eindeutige Identifizierung der Aminosäuren 2-13

war ein weiterer Beweis dafür, daß Serin (-O-Phosphopantethein) der N-Terminus des Peptids ist. Das PTH-Derivat des endständigen Serin-O-Phosphopantethein konnte nicht identifiziert werden. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich in der sehr polaren Struktur der prosthetischen Gruppe zu suchen, welche eine Extraktion des PTH-Derivats mit Äther unmöglich macht. Dasselbe Ergebnis wurde von Vagelos bei der Sequenzierung eines core-Peptids des ACP von FSS aus Rattenleber erhalten (44). Vagelos wies in der Aminosäureanalyse ("substraktiver Edman-Abbau") auch nach Abbau des Serin-O-Phosphopantetheins β -Alanin (d.h. Phosphopantethein) in stöchiometrischen Mengen nach. Es kann daher als sicher angenommen werden, daß PTH-Serin-O-Phosphopantethein bei allen Extraktionsschritten zusammen mit dem Peptid im Reaktionsgefäß verbleibt. Die Sequenz des tryptischen Peptids ist somit:

Ser-Thr-Val-Gln-Asn-Glu-Ile-Leu-Gly-Asp-Leu-Gly-Lys
|
O-Phosphopantethein-(^{14}C)Palmityl.

Tab. 6: Sequenzierung von PAS-oxydiertem Peptid T₂ mit modifiziertem Edman-Abbau (vgl. Text S.75 sowie (37,34, 43,41))

Rest Nr. a)	PTH-Aminosäure b)	freie Aminosäure (PTH/HJ) c)	Dansyl-d) Aminosäure	Sequenz
1	_e)	_e)	u.a.nicht signifikante Spuren Serin	Seryl-4'Phospho- pantethein (als Taurin-Derivat vgl. Text S.28
2	Thr	α -Aminobutter- säure	Thr	Thr
3	Val (Thr)	Val	Val	Val
4	Gln	Glu	/	Gln
5	Asn (Gln)	Asp	/	Asn
6	Glu	Glu	/	Glu
7	Leu/Ileu (Glu)	Ileu + Allo-Ileu	/	Ileu
8	Leu/Ileu	Leu	Leu	Leu
9	Gly	Gly	Gly(Leu)	Gly
10	Asp	Asp	/	Asp
11	Leu/Ileu (Asp)	Leu	Leu	Leu
12	Gly	Gly	/	Gly
13	/	/	ϵ -PTC-Lys ^{f)}	Lys

Erläuterung der Zeichen:

- kein Ergebnis / nicht untersucht () Spuren
- a) gezählt vom N-Terminus in Reihenfolge des Edman-Abbaus.
- b) Dünnschichtchromatographische Identifizierung nach (42), vgl. Text S. 44 .
- c) Nach reduktiver Hydrolyse der PTH-Aminosäuren mit HJ (43). Bestimmung im Aminosäureanalysator.
- d) Endgruppenbestimmung ("Dansyl-Edman"-Methode) gemäß (34,35) .
- e) Deutung vgl. Text S. 45 .
- f) Ohne vorherige HCl-Hydrolyse als Dansylderivat chromatographisch bestimmt.

3. Diskussion der Ergebnisse

a) Zur Struktur des ACP von FSS aus Hefe

Wie in Kap. VIII, 2c beschrieben, hat das ACP-Peptid T₂ die Struktur

1) Ser-Thr-Val-Gln-Asn-Glu-Ile-Leu-Gly-Asp-Leu-Gly-Lys

$\begin{array}{c} | \\ R \end{array}$

R = (¹⁴C)Palmitylphosphopantethein

Nach Aminosäureanalyse von peptischen Peptiden hatte Ayling (14) die folgende Struktur im ACP vorgeschlagen:

(Asx, Val) (Thr, Glx, Gly, Lys, Gly, Ser, Val)
 $\begin{array}{c} | \\ R \end{array}$

Die von Oesterhelt (19) gefundene Aminosäurezusammensetzung (Lys, Gly, Ser-(R), Val, Pro, Ala) konnte nicht bestätigt werden. Weder in Peptid T₂ noch in den peptischen Peptiden Aylings ist Ala und Pro enthalten.

Die Überlappung der Ayling'schen Peptide mit Peptid T₂ unter Berücksichtigung der Spaltungspezifität von Trypsin macht die folgende Struktur im ACP sehr wahrscheinlich:

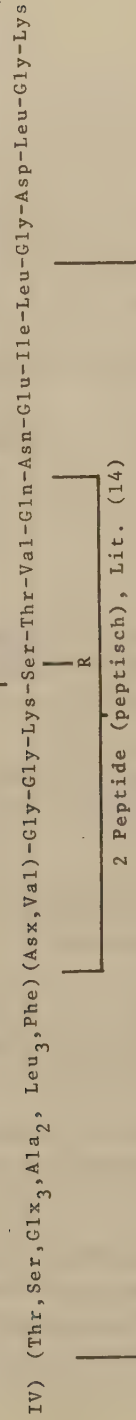
11) (Val-Asp)-Gly-Gly-Lys-Ser-Thr-Val-Gln-Asn-Glu-Ile -Leu-
 $\begin{array}{c} | \\ R \end{array}$ Gly-Asp-Leu-Gly-Lys

Bringt man ferner das Peptid T₁ soweit als möglich mit Struktur III) zur Deckung, so kann man als weitere Aminosäureumgebung des Serylantetheins Struktur IV) formulieren (s. S. 48).

Abb. 20 vergleicht ferner Hefe-ACP-Sequenz III) mit (soweit bekannt) gleichlangen Teilstücken aus ACP (E. coli) (31) und ACP (Rattenleber-FSS) (44).

Der Abbildung kann entnommen werden, daß Hefe- und E. coli-ACP in einem Strang von 18 Resten 4-5 gleiche Aminosäuren in analoger Position enthalten. Der Vergleich mit ACP (Rattenleber-FSS)

T₂ (tryptisches Hauptprodukt)



T₁ (tryptisches Nebenprodukt)

Struktur IV): Weitere Aminosäureumgebung der prosthetischen Gruppe Phosphopantethein von ACP aus FSS (Hefe). Erläuterung siehe Text S. 47

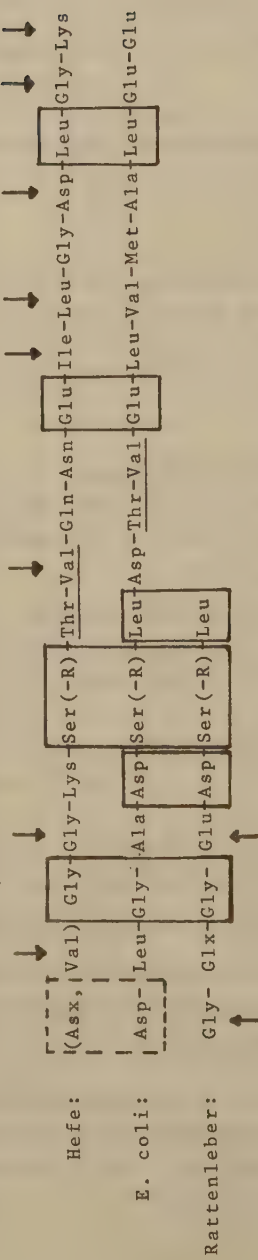


Abb. 20: Vergleich der Aminosäuresequenz von ACP aus FSS (Hefe), ACP aus E. coli und ACP aus FSS (Rattenleber) (31,44). Durch Pfeile gekennzeichnete Aminosäurepaare können durch Mutation nur einer Base ineinander überführt werden. Weitere Erläuterungen s. Text S.47 .

kann nur über einen Abschnitt von 7 Resten geführt werden. In diesem Abschnitt haben alle 3 Sequenzen die Aminosäure Glycin gemeinsam.

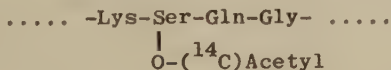
In Abb. 20 sind weiterhin jene Aminosäurepaare mit einem Pfeil markiert, welche (auf der Stufe der Proteinbiosynthese) durch Variation nur einer Base ineinanderübergeführt werden könnten. In dem gezeigten Peptidstrang von 18 Resten finden sich 8 solcher Paare.

Zusammenfassend kann man feststellen: Auf den beiden Teilsequenzen von 18 Resten sind

- a) 5 Paare identisch
- b) 8 Paare "ähnlich" (Punktmutation)
- c) 5 Paare nicht "ähnlich" (Austausch von mehr als einer Base nötig)

Ein deutlicher Unterschied zwischen E.coli-ACP und Hefe-ACP ist: Das kleinste, tryptische (d.h. ein Lysin enthaltende) Peptid aus E.coli-ACP hätte eine Länge von 43 Resten. Das tryptische Peptid T₂ aus Hefe-ACP besteht dagegen aus nur 13 Aminosäuren.

Erwähnenswert scheint schließlich noch die Ähnlichkeit mit dem von Ziegenhorn (24) sequenzierten Core-Peptid der Acetyltransferase von FSS (Hefe) zu sein:



Auch dort ist das Serin, welches - in diesem Fall direkt - den Acylrest trägt, einem Lysin benachbart.

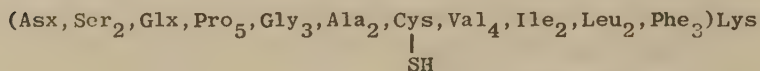
b) Zur Struktur des kondensierenden Enzyms

Die in Tab. 3 wiedergegebene Aminosäureanalyse sowie die Daten aus Tab. 2 machen wahrscheinlich, daß es sich bei Peptid T₇ um ein Teilstück des kondensierenden Enzyms handelt:

1. Das (^{14}C)Palmitylpeptid ist PAS-labil; als Träger des Palmitatrestes kommt daher nur eine SH-Gruppe in Frage.
2. Die einzige in der Analyse nachweisbare schwefelhaltige Aminosäure, Cystein, kommt in stöchiometrischer Menge vor.

Von Hagen (18) wurde nachgewiesen, daß die periphere SH-Gruppe des kondensierenden Enzyms identisch mit der SH-Gruppe eines Cysteinrestes ist (Isolierung von (^{14}C)Carboxyamidomethylcystein).

Wir nehmen daher an, daß das kondensierende Enzym im aktiven Zentrum die folgende Aminosäurezusammensetzung hat:



Erste Versuche, eine Teilstruktur des kondensierenden Enzyms aufzuklären, wurden von Oesterhelt (19) unternommen. Er isolierte 2(^{14}C)Carboxyamidomethylcystein-Peptide, T_A und T_B . Das größere von beiden, T_A , konnte er reinigen. Es bestand aus ca. 35 Aminosäuren und ist demnach größer als Peptid T_7 (ca. 28 Reste, unsicher ist die genaue Anzahl von Lysinresten). Möglicherweise ist daher Peptid T_7 identisch mit Peptid T_B .

IX. CHARAKTERISIERUNG DER PALMITYLTRANSFERASE IN FETTSÄURE- SYNTHETASE AUS HEFE

1. Vorbemerkung

Ayling (14) war es gelungen, 3 peptische (^{14}C)Palmitylpeptide zu isolieren, welche die Palmitinsäure in PAS-stabiler Bindung enthielten. Sie postulierte, daß das von Schweizer (45) charakterisierte (^{14}C)Malonyl-Peptid aus dem aktiven Zentrum der Malonyltransferase mit der von ihr formulierten Struktur identisch sei und zog den Schluß, daß Malonyl- und Palmityltransferase identische Enzymfunktionen seien.

Auch genetische Untersuchungen von Schweizer (15) lassen dieses Ergebnis zu: Er isolierte eine Vielzahl von Hefemutanten, welche bezüglich bestimmter Teilreaktionen der Fettsäuresynthese defekt sind. Bei allen auf Malonyl- und Palmityltransferase-aktivität geprüften Mutanten stellte er fest, daß grundsätzlich in einer untersuchten Mutante beide Enzymfunktionen defekt bzw. nicht defekt waren. Er konnte keine Spezies isolieren, welche nur in einer der beiden Enzymfunktionen Aktivität besaß (46).

Im Folgenden sei kurz die Isolierung von zwei PAS-stabilen (^{14}C)Palmitylpeptiden aus dem aktiven Zentrum der Palmityltransferase beschrieben. Eine Diskussion des Ergebnisses folgt in Kap. IX, 4.

2. Anreicherung der peptischen Peptide P_1 und P_2

Wie auf S.31 beschrieben, enthielt der Rückstand der tryptischen Spaltung neben freiem (^{14}C)Palmityl-CoA einen hohen Anteil an Palmitinsäure in PAS-stabiler Bindung (40 % der kovalent protein-gebundenen Radioaktivität). Da eine Nachspaltung mit Trypsin wenig sinnvoll erschien (vgl. S.15), wurde der gesamte Rückstand mit Pepsin behandelt. Durch 40-stündige Einwirkung von Pepsin wurde die anfänglich sehr trübe

Suspension in eine fast klare Lösung überführt. Nach Zentrifugation konnte eine geringe Menge festen Rückstands abgetrennt werden. Der Überstand wurde lyophilisiert. Butanol-extrakte beider Fraktionen wurden dann mit Ameisensäure bzw. PAS inkubiert und analog früheren Versuchen (vgl. S. 28) auf Dünnschichtplatten chromatographiert. Abb. 21 zeigt das Ergebnis. Sowohl im wasserlöslichen Überstand als auch im Rückstand der peptischen Spaltung befinden sich PAS-stabile Peptide. Da der Überstand nur maximal 10 % der gesuchten Peptide und zudem das gesamte wasserlösliche Spaltmaterial enthielt, wurde er verworfen. Um die beiden in Abb. 21, III gezeigten Peptide zu isolieren, gingen wir wie folgt vor:

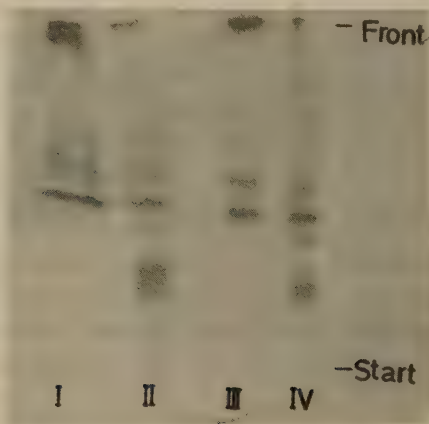


Abb. 21: Peptische Nachspaltung des Trypsin-unlöslichen Rückstands von (^{14}C)Palmityl-FSS. Dünnschichtchromatographie der resultierenden Palmitylpeptide:

I	im wasserlöslichen Überstand des Spaltansatzes (PAS-oxidiert)
II	" " " " " (Ameisensäure-behandelt)
III	im unlöslichen Rückstand (PAS-oxidiert)
IV	" " " (Ameisensäure-behandelt)

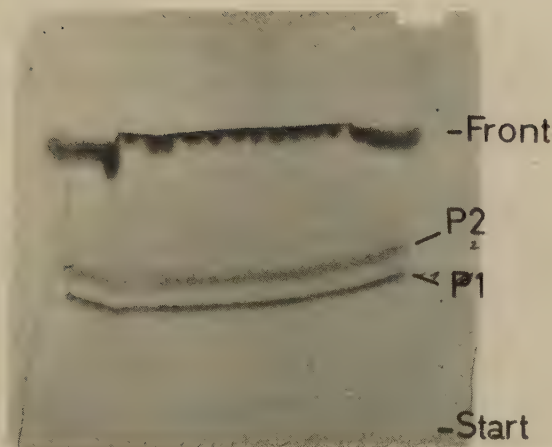


Abb. 22: Präparative Dünnschichtchromatographie der PAS-stabilen peptischen (^{14}C)Palmityl-Peptide P_1 und P_2 aus FSS; letzter Reinigungsschritt der mehrstufigen Präparation.

Kieselgel (0.25 mm), Laufmittel: Phenol:Butanol: H_2O :Eisessig= 2 : 2 : 1 : 1, Laufzeit 4 h.

Probe: 17 nMol (P_1) bzw. 9 nMol (P_2).

Nach Elution des Rückstands mit Lsgm. A wurde der getrocknete Extrakt mit PAS oxydiert. Auf diese Weise waren alle (^{14}C)-Palmitylthioester-Peptide in freie Palmitinsäure und wasserlösliche Peptide überführt worden. Die Anreicherung der PAS-stabilen Peptide erfolgte säulenchromatographisch wie in Kap. V,2 für die tryptischen Spaltprodukte beschrieben. Die Auftrennung von Peptid P_1 und P_2 auf einer präparativen Dünnschichtplatte zeigt die Abb. 22. Nach Elution mit Lsgm. E lagen beide Peptide, nach den Kriterien der Endgruppen- und Aminosäureanalyse, in sauberer Form vor.

3. Aminosäureanalyse und Teilsequenz der Peptide P_1 und P_2

In Tab. 7 ist die Aminosäureanalyse der beiden peptischen Palmityl-Peptide wiedergegeben.

Tab. 7: Aminosäureanalyse der PAS-oxydierten (^{14}C)Palmityl-peptide P_1 und P_2 .

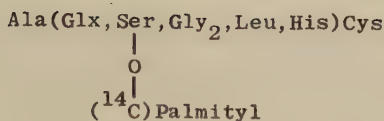
P_1 : 3,8 nMol P_2 : 2,9 nMol

Aminosäure a)	Peptid P_1 b)	Peptid P_2 b)
CysSO ₃ H	Spuren	0.80 (1)
Asp	Spuren	-
Thr	-	0.12
Ser	0.81 (1)	1.00 (1)
Glu	1.18 (1)	0.94 (1)
Gly	1.95 (2)	1.89 (2)
Ala	0.90 (1)	1.15 (1)
Ileu	-	Spuren
Leu	0.99 (1)	1.08 (1)
His	0.98 (1)	1.00 (1)

a) nicht aufgeführte Aminosäuren waren auch nicht in Spuren vertreten

b) Zahlenangaben: nMol Aminosäure/nMol Peptid (hierzu vgl. S. 72), in Klammern Zahl der Reste pro Peptidmolekül
Spuren: geringe Verunreinigungen (1-3 %).

Die Endgruppe beider Peptide war Ala, wie mit der Dansyl-Endgruppenanalyse (34) nachgewiesen wurde. Aus Tab. 7 ist ersichtlich, daß P_1 und P_2 sich um die Aminosäure Cys unterscheiden. Da Ala gemeinsame Endgruppe ist, muß Cys C-terminus von Peptid P_2 sein. Als Struktur im aktiven Zentrum der Palmityl-transferase wird somit vorgeschlagen:



Interessantes Ergebnis ist die identische Aminosäurezusammensetzung von Palmitylpeptid P_1 und Malonylpeptid B (Schweizer (45)).

Da die Ausbeute an Peptid P_2 nur 50 % der Ausbeute an P_1 betrug, wurde letzteres für die Sequenzanalyse verwendet. In einem Vorversuch wurde festgestellt, daß ein Edmanabbau ohne vorherige Modifizierung des Peptids (Palmitylpep. $\rightarrow$ Palmitinsäure + Pep.) nicht möglich war. Wahrscheinlich wird die Reaktion des Peptids mit PITC durch seine schlechte Löslichkeit verhindert. Einzig mögliche Modifizierung schien eine Behandlung mit 1) NaOH und 2) PAS (38, 40) zu sein, wie schon auf S.39 für das tryptische Peptid T_2 beschrieben. Da in Peptid P_1 die Palmitinsäure direkt an die OH-Gruppe des Serins gebunden war, wurden 2 Mechanismen diskutiert, nach denen ihre Abspaltung erfolgen konnte. Sie sind in Gl. 5 dargestellt. Reaktionsweg a) schien dabei der wahrscheinlichere zu sein.

Auf S.57 werden ferner die Konsequenzen für den Edman-Abbau gezeigt: Im Fall a) Blockierung des Abbaus, im Fall b) keine Blockierung.

Die Versuche wurden ausgeführt, wie im experimentellen Teil für Peptid T_2 (s.S. 74) beschrieben. Tab. 8 gibt einen Überblick über die Ergebnisse. Es ist ersichtlich, daß durch NaOH-Behandlung die seringebundene Palmitinsäure zu 100 % freigesetzt wird.

Aus den Angaben in Tab. 8 geht hervor, daß die Modifizierung von Peptid P_1 gemäß Gl. 5a verläuft. Der 3. Abbauschritt ist blockiert: Nach einem weiteren Edman-cyclus (4a) wird keine PTH-Aminosäure freigesetzt. Wird dann das (bei allen Reaktionen in demselben Glas verbliebene) Material mit alkalischem H_2O_2 behandelt (40), so ist nach einem weiteren Edman-Abbau (46)

Tab. 8: Ergebnis der Sequenzierung von (^{14}C)Palmityl-Seryl-Peptid P_1 aus FSS (10 nMol-Ansatz)

Edman- Abbau Nr. a)	PTH-Amino- säure b)	vorherige Modifikation des Peptids c)
1	Ala	1) NaOH ^{d)} 2) PAS
2	Gly	
3	-	
4a	-	
4b	Gly	3) NaOH/H ₂ O ₂
5	-	
6		

a) Edman-Abbau nach (37,41), vgl. Exper. Teil S. 75

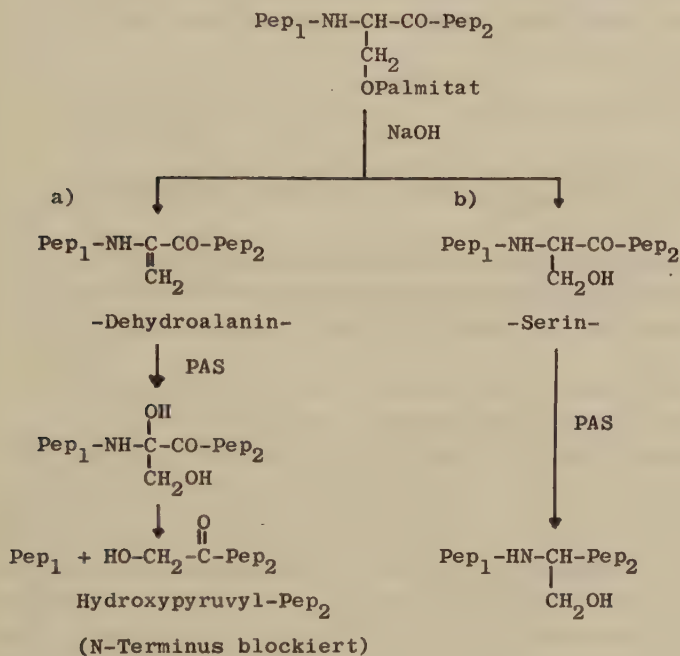
b) Identifizierung der PTH-Aminosäuren nach (42), vgl. Text S. 43 und S. 76

c) Modifizierungsreaktionen (38,40): vgl. auch Gl. 5 auf S. 57

d) mit Benzol extrahierbare Radioaktivität: vor NaOH-Beh.: 0 %
nachher : 100%

PTH-Gly eindeutig nachweisbar. Bei diesem PTH-Gly kann es sich nicht um verschleppte Spuren von Glycin (Rest-Nr. 2) handeln. Bei unvollständigem Edman-Abbau oder unvollständiger PTH-Extraktion in Schritt 2 wären zumindest Spuren von PTH-Gly in Schritt 3 und 4a gefunden worden. Die Freisetzung eines neuen N-Terminus nach NaOH/H₂O₂-Behandlung ist ein Hinweis darauf, daß Seryl-Palmitat die 3. Aminosäure im Peptid ist.

Gl. (5) Schema für die Sequenzierung von (^{14}C)Palmitylseryl-Peptid P_1 (PAS-stabil) aus FSS. Modifizierungsreaktionen nach (38,40). Erläuterung s. Text S. 55 .



Möglichkeit a):

Sequenzierung von Pep_1 möglich. Pep_2 blockiert. Nach Abspaltung von Hydroxypyruvat nach (40) (vgl. S.74) Sequenzierung von Pep_2 möglich.

Möglichkeit b):

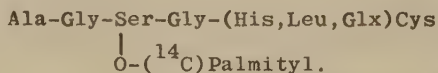
Sequenzierung bei keinem Schritt blockiert. Nachweis von (eventuell wenig (37)) PTH-Serin. Sequenzierung von Pep_2 ohne weitere Modifizierung möglich.

Eine weitere Sequenzierung über Schritt 4 hinaus gelang nicht. Entweder werden durch den großen Überschuß der bei den Modifizierungsreaktionen gebildeten Salze (vgl. Exp. Teil S.74) die Reaktionen des Edman-Abbaus gestört, oder es erfolgt die (blockierende) Modifizierung einer weiteren Aminosäure (Cyclisierung von Glu? (37)).

2 Möglichkeiten wären denkbar, um diese Schwierigkeit zu umgehen:

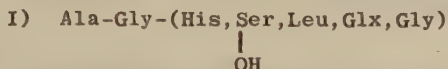
- 1) Die Verwendung von NH_3 anstelle von NaOH ; Entfernung von NH_3 im Vakuum.
- 2) Sequenzierung von nicht modifiziertem Palmitylpeptid unter Verwendung geeigneter Lösungsmittel bei der Reaktion mit PITC.

Aus Zeitgründen wurden jedoch keine weiteren Versuche zur Aufklärung der Sequenz unternommen. Aus den in Tab. 8 und oben angegebenen Resultaten geht hervor, daß die Struktur im aktiven Zentrum der Palmityltransferase wie folgt formuliert werden kann:



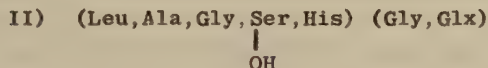
4. Diskussion der Ergebnisse

Die Aminosäureanalyse dreier von Ayling (14) isolierter Palmityl-Transferase-Peptide machte folgende Struktur im aktiven Zentrum dieser Enzymfunktion wahrscheinlich:

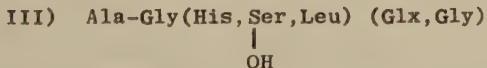


Ser-OH = Bindungsstelle des
Palmitylrests

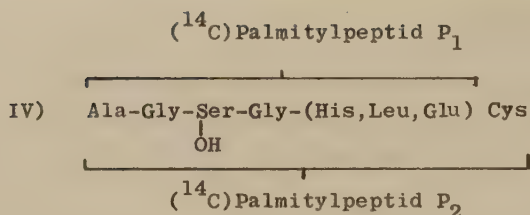
Von Schweizer (45) analysierte (^{14}C)Malonylpeptide lassen ferner den Schluß zu, daß die Struktur der Malonyltransferase im aktiven Zentrum wie folgt beschrieben werden kann:



Der Vergleich der Strukturen I) und II) sowie genetische Untersuchungen von Schweizer (hierzu vgl. S. 51) lassen den Schluß zu, daß Malonyl- und Palmityltransferase identische Enzymfunktionen sind. Unter dieser Annahme wäre nach Kombination der Teilsequenzen I) und II) die Struktur im aktiven Zentrum einer hypothetischen Malonyl/Palmityl-Transferase:



In der vorliegenden Arbeit konnten wir zwei PAS-stabile Peptide isolieren, welche sich um die Aminosäure Cystein unterscheiden. Das Heptapeptid P_1 war dabei mit einem der von Schweizer isolierten Malonyl-Peptide identisch. Nach einer teilweisen Sequenzierung von P_1 schlagen wir als Struktur im aktiven Zentrum der Palmityltransferase die folgende Teilsequenz vor:



Hierin ist der N-Terminus Ala-Gly- identisch mit dem der Struktur I) (Ayling, Palmityltransferase). Auf das "aktive Serin" hingegen folgt die Aminosäure Glycin und nicht, wie in der hypothetischen Struktur III) gefordert, Histidin oder Leucin.

Ohne genauere Kenntnis der Aminosäuresequenzen in den aktiven Zentren von Malonyl- und Palmityltransferase kann daher nicht von einer gleichen Primärstruktur gesprochen werden. Bestätigt wurde nur die gleiche Aminosäurezusammensetzung zweier Heptapeptide aus den aktiven Zentren.

X. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Verwendete Geräte

Packard, Tri-Carb, Liquid Scintillation Spectrometer Modell 314
Radiopapierchromatograph, Frieseke-Hoepfner mit FH 452 Linien-
schreiber

Dünnschichtscanner, Frieseke-Hoepfner,

LB 272 mit Dual Ratemeter-Integrator 2 B 242 K

Photometer Eppendorf, Netheler und Hinz, Hamburg, mit Philipps-
Kompensograph

Spektralphotometer Cary, Modell 14

Spektralphotometer, Zeiß, Modell M 4 Q II

Automatic Superspeed Centrifuge, Servall RC-2 und RC-2b

Präparative Ultrazentrifuge, Beckmann-Spinco, Modell L und
Modell L2 65 B

Tischzentrifuge, Christ, Superspeed Junior 1

Tischzentrifuge, Hettich

Fraktionskollektor, Serva

Säulenchromatographie-Zubehör, Serva

pH-Meter, Metrohm, Modell E 500

Autotitrator, Typ TTT 1b/SBR 2c, Radiometer

Hochspannungselektrophoresetank, Modell LT-48 A, Savant

Hochspannungsgleichrichter, Hölzel

Aminosäureanalysator LC 6000, Biotronik, mit Philipps-Schrei-
ber PM 8221

Fluoreszenzspektrophotometer MPF-3, Perkin-Elmer

Zellhomogenisator Manton-Gaulin, Schroeder, Lübeck

Zentrifuge 8 x 1350, Stock, Marburg

Rotavapor 'R', Büchi

Homogenisator, SG-Zauberstab

Gebläseschrank, heizbar, Heraeus

Brutschrank, Trockenschränke, Heraeus

UV-Lampe, Ultra-Violet Products, California

Microcaps (Drummond)

Mikroliterpipetten (Eppendorf).

2. Chemikalien, Substrate

Enzyme und Coenzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma C.F. Boehringer, Mannheim, bezogen.

Nicht eigens aufgeführte Chemikalien stammten von der Firma E. Merck, Darmstadt, und besaßen die höchste erhältliche Reinheit.

Bierhefe (Löwenbräu, München), Stamm S.

Serumalbumin (Rind) (Behringwerke, Marburg).

Sephadex G 25, G 50, LH 20 (Pharmacia, Uppsala)

Fluorescamin, «Fluoram» (Hoffmann-La Roche)

Butyl-PBD (Pierce), von Frau Dr. Henschen-Edman zur Verfügung gestellt.

Polyamid-Dünnschichtfolien (Schleicher und Schüll)

Kristallviolett, Xylencyanol FF, Orange G, ~~6~~ -DNP-Lysin (Fluka)

Varsol (Münoco, München)

Phenylisothiocyanat, Trifluoressigsäure, Dansylchlorid, PTH-Aminosäuren (Fluka)

Aminosäuren (Calbiochem)

pico-Puffer für Aminosäureanalyse, System II (Durrum)
nachgereinigter Stickstoff (Linde)

Dünnschichtplatten, Kieselgel (Analchem, Luton, England)

(1-¹⁴C)Palmitinsäure (Radiochemical Centre, Amersham, England)

Carbo-sil (Zinsser, Frankfurt)

PPO, POPOP (Packard Instruments, Frankfurt)

Autoradiographie-Zubehör (Photo Schaja, München):

Agfa Röntgenfilm, Osray T₄, 30 x 40 cm

Entwickler Tetenal Röntgen

Fixierer, Superfix Röntgen, Tetenal

Synthesen:

Acetyl-CoA wurde nach (47), Malonyl-CoA nach (48) hergestellt. Ausbeutebestimmung s.S. 64 .

3. Verzeichnis der verwendeten Lösungsmittelsysteme

Lsgm.	Zusammensetzung
A	Butanol/H ₂ O-Oberphase (1 % Eisessig)
B	Phenol:Butanol:H ₂ O:Eisessig = 2 : 2 : 1 : 1 (g/v/v/v)
C	Äther:Petroläther:Eisessig = 5 : 4 : 1
E	Methanol : H ₂ O : Eisessig = 5 : 2 : 1
Dansyl 1	1.5 % Ameisensäure in H ₂ O
Dansyl 2	Toluol : Eisessig = 10 : 1
Dansyl 3	Essigester:Methanol:Eisessig = 20 : 1 : 1
PTH 1	Toluol:nPentan:Eisessig = 60 : 30 : 35 250 mg Butyl-PBO/Liter
PTH 2	30 % Eisessig in H ₂ O

4. Allgemeine analytische Methoden

a) Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde die Biuretmethode nach Beisenherz et al. (49) verwendet (Biuretfaktor 8.6 (19)).

Für Routinebestimmungen wurde mit der Methode von Warburg und Christian (50) gearbeitet.

b) Radioaktivitätsbestimmung

Die zu untersuchende Probe wurde auf Papierstreifen (Whatman Nr.1, 3 x 7 cm) aufgetragen, im Luftstrom getrocknet und im Szintillationszähler ausgezählt.

Toluol-Szintillationslösung: 5 g PPO und 500 mg POPOP waren in einem Liter dest. Toluol gelöst.

Carb-o-Sil-Szintillationslösung enthielt zusätzlich 4 % Carb-o-Sil (Quellzeit ca. 15 min.).

c) Gehaltsbestimmung von Thioestern

Acetyl-CoA wurde enzymatisch nach der Methode von Buckel und Eggerer (51) bestimmt, Malonyl-CoA mit dem optischen Test für Fettsäuresynthetase.

Bestimmung von Palmityl-CoA s. S. 65 .

d) Autoradiographie

Das auf Radioaktivität zu untersuchende Material (Papier, DC-Platte) wurde mit Röntgenfilm in engen Kontakt gebracht und unter absolutem Ausschluß von Licht gelagert.

Behandlung von präparativen Dünnschichtplatten s.S. 70.

Entwicklung und Fixierung erfolgte nach Angabe der Herstellerfirmen (s. Verzeichnis der Chemikalien).

Empfindlichkeit der Methode: 1000 cpm (Isotop ^{14}C) auf einer Bande von 0.5 x 0.3 cm (Kieselgel) waren nach 15 h Belichtungszeit gut erkennbar.

5. Isolierung und Aktivitätsbestimmung von Fettsäuresynthetase

Für die Anreicherung der Fettsäuresynthetase wurde Bierhefe der Bäckerhefe vorgezogen. Erstere war nicht gelagert, sondern wurde direkt der Zucht-Suspension entnommen. Auf diese Weise war die gleichbleibende Qualität der Hefe gesichert. Effekte, die durch lange Lagerung der abgepreßten Hefe auftreten könnten (Schädigung des Enzyms), wurden vermieden.

Die Hefesuspension wurde mit H_2O (1:1) verdünnt, abzentrifugiert, 1 x mit K-Phosphatpuffer pH 7.5 gewaschen und nach erneuter Zentrifugation nicht länger als 15 h im Kühlraum (2-4° C) gelagert.

Die Anreicherung erfolgte in allen Einzelheiten wie in (19) beschrieben, mit Ausnahme der beiden folgenden Schritte:

- a) Der Aufschluß der Hefezellen wurde im Zellhomogenisator (Manton-Gaulin) als kontinuierlicher Prozeß durchgeführt. Auf diese Weise wurden 3 kg Hefesuspension (Volumen 12 l) in einem Zeitraum von 15-20 min. aufgeschlossen.

- b) Die Elution des Enzyms vom Ca-Phosphatgel erfolgte in Zentrifugenbechern (Stock) mit Hilfe eines Haushaltsmischgerätes (SG-Zauberstab). Nach 4 Elutionen mit je 800 ml Puffer befand sich das Enzym in Literatúrausbeute im Überstand der Zentrifugationen.

Auf diese Weise präpariertes Enzym zeigte in der Disk-Elektrophorese keine oder unwesentliche Verunreinigungen. Es wurde in 0.1 M K-Phosphat pH 6.5 (0.001 M an Dithiothreitol) gelagert und bei Bedarf entsalzt (Sephadex G 25 oder Ultrazentrifugation) oder direkt beladen und zur Peptidpräparation aufgearbeitet.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im Standard-Enzymtest (19). Im Küvettenvolumen (1 ml) war enthalten: 100 μ Mol K-Phosphat pH 6.5, 10 μ Mol Cystein, 0.2 mg Serumalbumin, 0.07 μ Mol Acetyl-CoA, 0.2 μ Mol NADPH und 3-8 g Enzym. Nach 2-3 Minuten dauern- dem Blindlauf wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.1 μ Mol Malonyl-CoA gestartet. Meßgröße war die Änderung der Extinktion bei $\lambda = 334 \text{ m}\mu$ (25° C).

1 Einheit ist die Enzymmenge, welche unter Testbedingungen 2 μ Mol NADPH pro Minute umsetzt (entsprechend dem Verbrauch von 1 μ Mol Malonyl-CoA pro Minute).

6. Synthese und Reinigung von (1-¹⁴C)Palmityl-CoA

Die Synthese von (1-¹⁴C)Palmityl-CoA erfolgte in allen Einheiten nach (22). Die Ausbeuten eines einfachen heißen und eines 5-fachen kalten Ansatzes (je ca. 40 % Ausbeute) wurden vereinigt und ergaben (¹⁴C)Palmityl-CoA der gewünschten spezifischen Radioaktivität (ca. 1 μ Ci/ μ Mol). Das Produkt wurde dreimal mit Petroläther sowie dreimal mit Essigester ausgeschüttelt. Die Reinheitsprüfung wurde in analytischer Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Laufmittel B) durchgeführt.

Bei Anwesenheit von mehr als 10 % Verunreinigung (alte CoA-SH-Chargen) wurde die Verteilungschromatographie an Sephadex G 50 als Reinigungsschritt angewendet, wie in (22) beschrieben.

Die Ausbeutebestimmung erfolgte durch Messen der Absorption bei 260 m μ (Adenin) und 232 m μ (Thioester). Im letzteren Fall wurde eine Lösung mit äquimolarem Gehalt an CoA-SH in die Referenzküvette pipettiert. Bei sauberen Präparationen war

$$E_{260} : E_{280} = 1 : 1.$$

7. Markierung der Acceptorgruppen, Entfernung von überschüssigem Palmityl-CoA (zu Kap. IV und VII).

FSS von der spezifischen Aktivität 1800 - 2100 mE/mg wurde durch Sephadex 625-Filtration oder Ultrazentrifugation entsalzt. Die Beladung erfolgte in 0.1 M K-Phosphat pH 6.5, 0.001 M an Dithiothreit. Bei 0° C wurden 100-1200 mg Enzym (Proteinkonzentration 10 mg/ml) mit (¹⁴C)-Palmityl-CoA (ca. 1 μ Ci/ μ Mol) bis zu einer Endkonzentration von 2×10^{-4} M versetzt. Inkubationsdauer: 8 Min. (14).

Dann wurde der Ansatz unter starkem Rühren in das 5-6-fache Volumen Butanol überführt (Stock-Zentrifugenbecher). Das denaturierte Protein wurde abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Entfernung von überschüssigem Palmityl-CoA erfolgte durch Homogenisation des Proteins mit Butanol:Äthanol:0.03 N HCl = 1:1:1 (30 ml pro Waschgang) im Omnimix. Nach jedem Reinigungsschritt wurde das Protein durch Zentrifugation bei 37 000 g von der Waschflüssigkeit getrennt. Nach maximal 6 Waschgängen war die Radioaktivität im Überstand auf einen konstanten Wert abgesunken. Nach 2-3 weiteren Waschgängen wurde das Protein erst mit Butanol, dann mit Äther gewaschen und schließlich im Exsikkator getrocknet.

Inkubation von FSS mit Jodacetamid:

Bedingungen der Reaktion mit Jodacetamid waren wie in (19) beschrieben. FSS-Lösung (0.1 M K-Phosphat pH 6.5) wurde mit Jodacetamid versetzt (0.02 M) und 10 min bei 0° inkubiert. Nach 2 min war die Gesamtaktivität auf einen nicht mehr meßbaren Wert abgesunken. Die Reaktion wurde durch Zugabe der 10-fachen Menge an Cystein gestoppt, und das Protein durch Ultra-

zentrifugation isoliert. Die anschließende Beladung mit (^{14}C)Palmityl-CoA erfolgte wie oben beschrieben.

8. Tryptische Spaltung von (^{14}C)Palmityl-FSS

a) Spaltung und Extraktion

Die tryptische Spaltung wurde in einem Autotitrator unter Stickstoff durchgeführt (24). Das mit Butanol denaturierte und von überschüssigem Palmityl-CoA befreite Protein wurde mit Hilfe eines Homogenisators fein zerteilt und in 0.001 M CaCl_2 -Lösung suspendiert (Protein-Konzentration 6-15 mg/ml). Durch Zugabe von 0.05 - 0.1 N NaOH wurde der pH auf 6.80 - 6.90 eingestellt. Nach Zusatz von 15 Gew. % Trypsin (TPCK-behandelt, lyophilisiert, 2.0 E/mg, in wenig 0.001 N HCl gelöst) wurde das Reaktionsgemisch bei 37° C inkubiert (Rühren). Der pH-Stat hielt den pH-Wert durch automatische Zugabe von NaOH konstant. Nach 7 h wurde mit Eisessig auf pH 5.0 - 6.0 angesäuert und die Suspension zentrifugiert. Der Überstand wurde für analytische Zwecke lyophilisiert; bei präparativen Ansätzen verworfen, der Rückstand 3-mal mit H_2O gewaschen, getrocknet und anschließend mit Lsgm. A extrahiert. Der Extrakt, welcher die Palmitylpeptide enthielt, wurde am Rotationsverdampfer (Luftbad, Kühlung der Vorlage: flüss. N_2) eingeeengt.

In einem Kontrollversuch wurde (^{14}C)Palmityl-CoA analog mit Trypsin behandelt. Dünnschichtchromatographie des Palmityl-CoA vor und nach Inkubation, sowie einer Mischung beider Chargen (Kieselgel, Laufmittel B) zeigte, daß Palmityl-CoA durch Trypsineinwirkung bei pH 6.80-6.90 nicht modifiziert wird.

Der Rückstand der Elution, welcher keine nennenswerten Mengen löslicher Palmitylpeptide mehr enthielt, wurde getrocknet und für die peptische Nachspaltung aufbewahrt.

b) Papierelektrophorese

Hochspannungspapierelektrophorese nach Michl wurde in allen Einzelheiten gemäß (27) durchgeführt. Die Tanks enthielten Varsol als Kühlflüssigkeit, sowie folgende Puffersysteme:

pH 6.4 : Pyridin : Eisessig : H_2O = 25 : 1 : 349

pH 3.5 : Pyridin : Eisessig : H_2O = 3.3 : 33 : 1463.7

Als Standardsubstanzen wurden benutzt: Kristallviolett, Orange G, Xylencyanol FF, ● -DNP-Lysin, Lysin, Asparaginsäure. Trägermaterial war Whatman-3 MM-Papier (46 x 110 cm). Die Probe wurde mit Mikropipetten (Eppendorf) aufgetragen und das Papier anschließend in die Halterung gespannt. Dann wurden beide Seiten der Startzone mit Puffer befeuchtet (Pipette), um eine Konzentration des aufgetragenen Materials zu erreichen. Nach Anfeuchten der restlichen Papierfläche wurde die Elektrophorese begonnen. Die angelegte Spannung betrug 5500 V, die Laufzeiten 1.5 - 3 h.

Nach beendetem Lauf wurde das Papier in der Halterung bei Raumtemperatur (Abzug) getrocknet. Die Lokalisierung von Peptidbanden erfolgte mit frisch hergestellter Fluorescamin-Lösung (1 mg/10 ml dest. Aceton, 1 % Pyridin). Die ausgeschnittenen Papierstreifen wurden durch 20-50 ml Reagenzlösung gezogen und bei Raumtemperatur getrocknet. Im UV-Licht waren die Peptide anschließend als gelb fluoreszierende Flecken erkennbar. Empfindlichkeit: 1 nMol Peptid auf 0.5 cm breiter Zone war gut erkennbar.

Besprühen des Papiers mit Fluorescamin-Lösung hatte wesentlich schlechtere Ergebnisse zur Folge. Wegen der großen Empfindlichkeit der Methode wurde das Elektrophoresepapier nur mit Handschuhen berührt.

Radioaktive Banden wurden im Papier-Scanner oder autoradiographisch lokalisiert.

9. Säulenchromatographie (zu Kap. V,2)

a) Verteilungschromatographie an Sephadex G 50

Der Reinigungsschritt wurde gemäß (14) durchgeführt. Sephadex G 50 wurde 2 Tage in Butanol H_2O -Unterphase (1 % Eisessig) gequollen. Nach Füllen der Säule wurde mit Oberphase (1 % Eisessig) = Lsgm. A äquilibriert. Die Probe wurde in minimalem Volumen Elutionsmittel gelöst, aufgetragen und durch zweimaliges Spülen in das Gelbett überführt. Dann wurde mit Lsgm. A die Elution begonnen (Druck: 1-1.5 m Lsgm. - Säule). Für 40-60 nMol Peptidmaterial wurden Säulen der Größe 30×0.6 cm, Gelbettvolumen ca. 8 cm^3 , verwendet. Der Verlauf der Elution wurde durch Fluorescamintüpfeltest (s. Papierelektrophorese S. 67) sowie durch Messung der Radioaktivität verfolgt. Palmitylpeptidhaltige Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt (Luftbad). Die Ausbeute betrug 80-90 %.

b) Chromatographie an Sephadex LH 20

Sephadex LH 20 wurde in 0.2 M Pyridin-Acetat pH 6.5 gequollen und die Säule damit beschickt. Füllung, Äquilibrierung und Bestimmung von V_0 geschah nach (28). Eine Säule der Größe 1.6×55 cm war ausreichend für die Reinigung von 40-50 nMol Palmitylpeptiden. Diese wurden in einem minimalen Volumen Lsgm. A gelöst, aufgetragen und durch 1-2maliges Spülen in das Gelbett überführt. Die wasserlöslichen Verunreinigungen konnten anschließend durch Elution mit Pyridin/Acetat-Puffer (4-faches V_0) eluiert werden (Fluorescamintest). Die Palmitylpeptide wurden mit Hilfe eines linearen Gradienten eluiert. Mischgefäß: 80 ml Puffer, Vorratsgefäß: 100 ml Propanol (90 %ig). Die Füllhöhe wurde entsprechend der Dichte der beiden Flüssigkeiten gewählt. Ausbeute des Reinigungsschritts: 60-70 %. Nach beendeter Elution wurde das Gelbett mit 90 %igem Propanol gespült. Die Rückführung in die wässrige Form erfolgte durch Anlegen eines umgekehrten Gradienten.

10. Präparative Dünnschichtchromatographie (zu Kap. V, 3b)

Gute und reproduzierbare Trennleistungen wurden nur mit Dünnschichtplatten der Firma Analchem erhalten. Die Beschichtung wurde im Aminosäureanalysator stichprobenweise auf Protein- bzw. Aminosäuregehalt getestet. Eine Aktivierung der Platten erfolgte nicht.

Auf eine Platte der Schichtdicke 0.25 mm wurden 60-80 nMol Peptidmaterial aufgetragen. Lösungsmittel für die Palmitylpeptide war Lsgm. E oder A. Auf eine Platte konnten ohne Schädigung der Schicht 0.10 - 0.15 ml aufgetragen werden. Nach sorgfältiger Trocknung der Startzone wurde das Chromatogramm in frisch hergestelltem Lsgm. B entwickelt (Äquilibriumierung des Tanks 1-2 h). Die Laufzeiten betrugen 4-5 h. Anschließend wurden die Chromatogramme im Luftstrom bei Raumtemperatur (Gebläsetrockenschrank) für mindestens zwei Stunden getrocknet. Bei zu kurzen Trocknungszeiten haftete die Kieselgelschicht stellenweise an der (proteinhaltigen!) wasserlöslichen Gelatineschicht des Autoradiographiefilms. Um die Belichtungszeiten für die Autoradiographie kalkulieren zu können, wurden die Intensitäten der einzelnen Banden grob im Dünnschichtscanner ermittelt (unter Zuhilfenahme von Eichchromatogrammen mit bekanntem Radioaktivitätsgehalt). Vor Beginn der Belichtung wurde die Platte mit radioaktiver Tinte ((¹⁴C)Palmitinsäure, Farbstoff, Benzol) beschriftet und mit Punkten markiert, so daß später - für die Elution der Peptide - Film und Dünnschichtplatte zur Deckung gebracht werden konnten.

Die Lagerung von Film und Platte erfolgte in einem lichtdichten Umschlag, der zwischen 2 PVC-Platten gelegt wurde, im Kühlraum bei 2-4° C. Dauer der Belichtung, Entwicklung, Fixierung s. "Autoradiographie" S.64 .

Die Elution der Peptide wurde wie folgt durchgeführt: Auf einer leuchtenden Unterlage wurde das Autoradiogramm direkt auf durchsichtiges Papier übertragen. Dieses wurde mit der Dünnschichtplatte zur Deckung gebracht und die Markierungen mit einem

spitzen Bleistift durch das Papier hindurch in das Kieselgel gezeichnet. Eine Nachprüfung der Markierung erfolgte durch Übereinanderlegen von Film und Platte. Dann wurden die radioaktiven Banden mit einer Rasierklinge abgekratzt. Die Dünnschichtplatten sowie alles für die Elution benutzte Gerät wurde nur mit Handschuhen berührt. Die so isolierten Kieselgelfractionen wurden in Plastik-Zentrifugengefäßen (Eppendorf, 1.5 ml) 3 x mit Lsgm. E eluiert. Nach Bestimmung der Radioaktivität wurden die Eluate am Rotationsverdampfer getrocknet.

Um die Ausbeute kalkulieren zu können, wurde von jeder Kieselgelfraktion ein Aliquot vor und nach Elution auf Radioaktivität geprüft. Hierzu wurde das Kieselgel mit Toluol/Carb-o-Sil-Szintillationsmedium emulgiert und ausgezählt. Eine Eichkurve mit bekannten Mengen (^{14}C)Palmityl-CoA auf Papier bzw. in Carb-o-Sil-Medium wurde angefertigt und ergab, daß mit beiden Methoden die Radioaktivitätsbestimmung in gleicher Zählausbeute möglich ist.

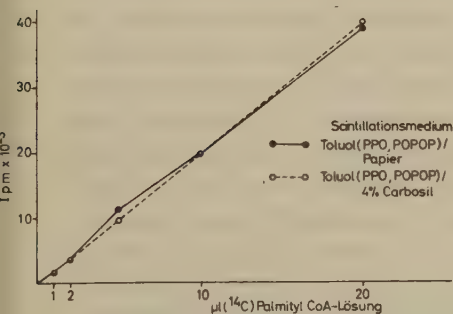


Abb. 23: Eichkurve zur Radioaktivitätsbestimmung mit Toluol/ 4 % Carb-o-Sil/PPO, POPOP.

Aus den Werten wurde die spezifische Radioaktivität des Kieselgels, in cpm/mg Kieselgel, für jedes Peptid vor und nach Elution errechnet. Hiernach betrug die Ausbeute der Elution 70-80 %. Ein Verlust an Gesamtradioaktivität war auf mit-chromatographierte freie Palmitinsäure und freies Palmityl-CoA zurückzuführen, welche beide nicht eluiert wurden.

11. Perameisensäureoxydation (zu Kap. VI)

Die Herstellung von PAS erfolgt wie in (20) beschrieben. Eine Mischung von Ameisensäure/ H_2O_2 / H_2O = 8 : 1 : 1 wurde 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Probe 4 h bei 0°C in der gebildeten PAS inkubiert. Als Kontrollversuch wurde jeweils die gleiche Menge Probematerial unter analogen Bedingungen in Ameisensäure/ H_2O = 8 : 2 inkubiert.

Nach beendeter Reaktion wurde das Reagenz im Vakuum über NaOH entfernt. Bei größeren Ansätzen wurde die Probe mit der 10-20-fachen Menge H_2O verdünnt und lyophilisiert.

12. Aminosäureanalyse (zu Kap. VIII, 1 und IX,3)

Zu analysierende Peptide wurden wie folgt vorbereitet (35): 0.5 - 5 nMol Probe wurden in dickwandige Zentrifugengläser (73 x 11 mm) überführt, falls nötig mit PAS oxydiert und anschließend über NaOH im Exsikkator intensiv getrocknet (mehrmaliges Aufnehmen der Probe in H_2O , trocknen über Nacht im Vakuum), um jegliche Störung der Hydrolyse durch Anwesenheit von H_2O_2 auszuschließen. Dann wurde 5.7 N HCl (2 Teile H_2O + 3 Teile konz. HCl über SnCl_2 bidestilliert), 0.1 %ig an Thioglykol (frisch hergestellte Lösung von 1 μl Thioglykol in 1 ml HCl), zugegeben, zentrifugiert und das Glas auf 10^{-3} Torr evakuiert, wobei die Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Nach kurzem Auftauen wurde das evakuierte Glas zugeschmolzen. Hydrolysebedingungen (35): 24 h bei 106°C . Nach Ende der Reaktion wurde die abgekühlten Gläser zentrifugiert und einzeln, sofort nach dem Öffnen, am Rotationsverdampfer (Badtemperatur $35-40^\circ\text{C}$) getrocknet, einmal in H_2O aufgenommen und erneut getrocknet. Das Aminosäuregemisch wurde in Probenpuffer pH 2.2 (52) aufgenommen und der automatischen Aminosäureanalyse unterworfen (Einsäulensystem). Der Fehler einer 5 nMol-Analyse lag bei maximal 3 %.

Auswertung der Analysen: Aus den erhaltenen Werten (nMol Aminosäure) wurde der Anteil jeder Aminosäure (nMol/nMol Peptid) errechnet. Um die zur Analyse eingesetzte Menge Peptid möglichst genau bestimmen zu können, wurde der Mittelwert aus

- a) eingesetzter Radioaktivität ($= x \text{ nMol}$)
- b) den für die (hydrolysenstabilen) Aminosäuren gefundenen Werten gebildet.

Auf diesen Mittelwert wurden die gefundenen Mengenwerte bezogen.

Sämtliche für peptidchemische Analysen verwendete Glasgeräte wurden vor Gebrauch intensiv mit 1) Detergentien 2) Chromschwefelsäure 3) H_2O (15-stündiges Spülen) 4) H_2O dest. gereinigt und in verschlossenen Gefäßen verwahrt.

13. Endgruppenanalyse (zu Kap. VIII, 2a)

Die Endgruppenanalysen wurden, mit geringen Modifizierungen (35), in allen Einzelheiten nach (34) mit 0.5 - 1 nMol Peptid Peptid vorgenommen. Die Reaktionen wurden in dickwandigen Zentrifugengläschen (42 x 6 mm) durchgeführt, wobei durch Zentrifugation die geringen Flüssigkeitsmengen (10-20 μl) jeweils am Boden des Glases vereinigt wurden. Die Trocknung zwischen den Reaktionsschritten erfolgte im Exsikkator (Ölpumpe, Kühlfalle: flüssig. N_2 , geeignetes Trockenmittel).

Die Dünnschichtchromatographie der Dansylaminosäuren erfolgte in 3 Laufmitteln (s.S.63) auf Polyamidfolien (7.5 x 7.5 cm). Hierzu wurde ein eigens hergestellter Rahmen (Werkstatt MPI f. Biochemie) benutzt, welcher die gleichzeitige Chromatographie von 8 Plättchen unter total identischen Bedingungen ermöglichte. Für gute und reproduzierbare Trennungen waren frisch bereitete Laufmittel, sowie ausreichende Trocknungszeiten (15 min., Luftstrom, nach jeder Entwicklung) unerlässlich.

Als Marker wurden verwendet: Dansyl-Leu, -Ile, -Phe, -Gly, -Glu, -Ser. Es wurde auf die vordere Seite der Folie die Probe, hinten Probe und Markermischung mit 1 μ l-Microcaps aufgetragen. Empfindlichkeit: 0.1 - 0.2 nMol Dansyl-Aminosäure waren noch gut erkennbar (UV-Beleuchtung).

14. Serinspaltung (zu Kap. VIII, 2b und IX,3)

Die Serinspaltung der Peptide T₂ und P₁ erfolgte in zwei Stufen:

1) Abspaltung von Phosphopantethein unter Bildung des Dehydroalaninpeptids:

Hierzu wurden 5-8 nMol Peptid mit 50 μ l 0.2 N NaOH versetzt und bei 37° C 30 min. inkubiert. Nach Ansäuern mit 50 μ l 2 N HCl wurde das Dehydroalaninpeptid im Vakuum getrocknet. Dann wurde es in wenig H₂O gelöst und 1 nMol zur Endgruppenbestimmung entnommen.

2) Spaltung des Dehydroalaninpeptids:

Methode 1 (19): Das getrocknete Dehydroalaninpeptid wurde mit 200 μ l 1.5 N HCl in ein Analysenglas überführt und nach Evakuieren und Zuschmelzen des Glases 90 min. bei 110° C inkubiert. Nach Abkühlen und Öffnen der Ampulle wurde ein Aliquot für die Endgruppenbestimmung entnommen. Die größere Menge diente zum enzymatischen Nachweis von Pyruvat mit Lactatdehydrogenase (53). Dieser wurde in allen Einzelheiten nach (19) durchgeführt. Der Testansatz enthielt im Küvettenvolumen von 0.15 ml (Spezialküvette): 50 μ l Trispuffer pH 7.5, 30 nMol NADPH, und 1-3 nMol Pyruvat, bezogen auf eingesetztes Peptid. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μ l = 5 γ LDH gestartet. Meßgröße war die Abnahme der Extinktion bei 334 m μ . Eine zuvor angefertigte Eichkurve zeigte eine lineare Abhängigkeit der Extinktionsänderung von der zugegebenen Menge Pyruvat (1-10 nMol).

Methode 2: Das getrocknete Dehydroalaninpeptid wurde 2 h bei 0° C mit PAS inkubiert und danach sorgfältig getrocknet. Dann wurden 100 μ l 0.1 N NaOH sowie 10 μ l H₂O₂ zugegeben. Nach

30-minütiger Inkubation bei 37° C wurde der Ansatz lyophilisiert, wiederholt in H₂O aufgenommen und getrocknet (Entfernung von H₂O₂). Dann wurde mit 100 µl 1.5 N HCl angesäuert und zur Trockene evakuiert. Zur Bestimmung der dem Serin benachbarten Aminosäure (neuer N-Terminus) wurde ein Aliquot zur Dansylendgruppenbestimmung entnommen.

15. Sequenzanalyse (zu Kap. VIII, 2c und Kap. IX,3)

Die angewendete Methode war eine Kombination der in (37), (41) und (35) beschriebenen Arbeitsweisen.

Im folgenden wird ein Abbaucyclus schematisch dargestellt. Das Peptid blieb während aller Reaktionen in demselben Glas (Schliffzentrifugenglas 8.2 x 1.2 cm äußerer Durchmesser, Sonderanfertigung). Peptid T₂ wurde vor Beginn der Sequenzierung durch PAS-Oxydation in eine lösliche Form überführt,

Arbeitsweise:

- 1) Peptid trocknen (10-50 nMol)
- 2) 100 µl H₂O zufügen. Falls nötig Probenentnahme zur Bestimmung der Endgruppe nach der Dansyl-Methode
- 3) Kupplung: 100 µl einer Lösung von PITC in Pyridin (5 %ig, frischbereitet) zugeben, mit N₂ spülen, 1 h bei 45° C inkubieren, abkühlen, dann 2 x mit je 0.5 ml Benzol extrahieren, zentrifugieren. Benzolextrakt zur eventuellen Kontrolle auf Extraktionsverluste aufbewahren (Aminosäureanalyse). Falls Verluste, nur 1 x extrahieren.
- 4) In vorgewärmtem Exsikkator (60° C) trocknen. Trockenmittel: NaOH und H₂SO₄. Trockenzeit ca. 45 min. Rückstand muß kristallin aussehen und darf keinerlei Feuchtigkeit mehr enthalten.
- 5) Spaltung: 200 µl TFA zugeben, 15 min. bei 40° C inkubieren. (Falls Glu als nächster Rest erwartet, den Schritt nötigenfalls auf 5 min. verkürzen (37,35)).
TFA mit N₂ verblasen: Bildung eines dünnen Films an der Glaswand. Kurz im Exsikkator trocknen (NaOH).

6) Extraktion des Thiazolinons: Mit frisch über bas. Al_2O_3 gereinigtem Äther (ca. 1 ml) den Film durch vorsichtiges Schwenken des Glases extrahieren, Äther mit ausgezogener Pasteurpipette absaugen, in spitzes Zentrifugenglas überführen, mit N_2 verblasen. Dann Umlagerung zum PTH-Derivat durchführen.

7) Wiederholung von Schritt 1-6.

Die Umlagerung der Thiazolinone geschah exakt nach Edman (37). Die mit Essigester extrahierten PTH-Aminosäuren wurden im N_2 -Strom getrocknet, in 10-100 μl Methanol gelöst und bei -20°C unter Lichtausschluß gelagert.

Wesentlich für die Sequenzanalyse war die Sauberkeit der verwendeten Reagentien. Da die zur PTH-Aminosäurechromatographie verwendeten Polyamidfolien eine sehr geringe Kapazität haben, sollen sich zudem möglichst wenig Nebenprodukte akkumulieren. Bei der beschriebenen Methode wurden diese bis zum 12. Abbauschritt wirksam durch die beiden Benzolextraktionen entfernt. Verbliebene Reste bildeten 2 definierte Flecken auf dem Chromatogramm (s. unten) und störten nicht.

Alle Lösungsmittel und Reagentien wurden nach Vorschrift (37) gereinigt und unter N_2 aufbewahrt. PITC wurde wöchentlich frisch destilliert und bei -20°C gelagert. Die Lösung im Pyridin wurde in kleinen Mengen jeweils frisch hergestellt. Da geringste Mengen von Peroxiden die Sequenzierung blockieren können (41), wurde der Äther direkt nach seiner Reinigung über Al_2O_3 verwendet und möglichst kurz mit dem Peptid in Berührung gebracht.

Identifizierung von PTH-Aminosäuren

a) Chromatographie auf Polyamidfolien

Hierzu wurden doppelseitig beschichtete Polyamidfolien (5 x 5 cm) verwendet. Eine Markermischung enthielt folgende PTH-Aminosäuren in Methanol gelöst: Leu, Met, Pro, Val, Thr, Ser, Tyr,

Asp. Es wurde (mit 1 μ l-Microcops) vorne die Probe, hinten Probe und Markermischung aufgetragen. Auf diese Weise konnten nach 2-dimensionalen Entwicklung des Chromatogramms in den Laufmitteln PTH₁ und PTH₂ (s. S. 63) alle Aminosäuren getrennt werden (Ausnahme: Leu/Ileu). Die Beimischung des Fluoreszenzindikators Butyl-PBD zum 1. Laufmittel ermöglichte die Identifizierung von 0.5 nMol PTH-Aminosäure nach dem Prinzip der Fluoreszenzlösung (Auswertung des Chromatogramms im UV-Licht).

b) Reduktive Hydrolyse der PTH-Aminosäuren (43, 35)

Der nicht für die Chromatographie verwendete Anteil der PTH-Derivate wurde in ein Analysenglas überführt, getrocknet, mit 200 μ l HJ versetzt, evakuiert und zugeschmolzen (s. Aminosäureanalyse). Vor dem Zuschmelzen der Ampulle wurde diese mehrmals mit Stickstoff belüftet und erneut evakuiert (Dreiweghahn). Reaktionsbedingungen: 20 h bei 130° C. Nach Ende der Hydrolyse wurde die Probe getrocknet und im Aminosäureanalysator untersucht, wie im Kap. "Aminosäureanalyse" auf S.72 beschrieben. Hierbei wurden Allo-Ileu, Ileu, Leu in der angegebenen Reihenfolge im Standardprogramm aufgetrennt. Empfindlichkeit der Methode: 0.5 nMol waren qualitativ, Mengen über 1 nMol quantitativ gut auswertbar.

16. Peptische Spaltung (zu Kap. IX, 2)

Die peptische Spaltung wurde ausgeführt, wie in (24) beschrieben. Das Protein wurde in 0.01 N HCl in einer Konzentration von 1 mg/ml feinst suspendiert. Dann wurde 1/10 der Gewichtsmenge an Pepsin zugegeben (gelöst in 0.01 N HCl) und die Mischung 40h bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Nach 24 h wurde 1/40 des Gewichts an Pepsin erneut zugegeben. Nach beendeter Reaktion wurde die Suspension zentrifugiert, der Rückstand mit H₂O gewaschen und mit Lsgm. A extrahiert (vgl. "Tryptische Spaltung"). Der Überstand wurde für analytische Zwecke lyophilisiert und das trockene Spaltmaterial ebenfalls mit Lsgm. A extrahiert.

XI. ZUSAMMENFASSUNG

Fettsäuresynthetase wurde mit (^{14}C)Palmityl-CoA beladen. Nach Denaturierung und Spaltung des (^{14}C)Palmitylenzym konnten (^{14}C)Palmitylpeptide isoliert werden. Diese zeichneten sich gegenüber der Hauptmenge der Spaltprodukte durch ihre ausgeprägte Lipophilie aus. Unter Ausnutzung dieser Eigenschaft gelang ihre vollständige Abtrennung von wasserlöslichem Material. Das Gemisch von Palmitylpeptiden konnte durch präparative Dünnschichtchromatographie in die einzelnen Komponenten aufgetrennt werden. Hierbei wurden 7 radioaktive Peptidbanden isoliert. Auf Grund ihrer spezifischen Eigenschaften konnten die Peptide aus dem ACP bzw. aus kondensierendem Enzym und Palmityltransferase identifiziert und von einander unterschieden werden. Drei der isolierten Peptide waren sauber nach den Kriterien der Aminosäureanalyse. Ein Peptid aus dem ACP war von Ausbeute und Reinheit her für die Sequenzierung besonders geeignet. Es enthielt 13 Aminosäuren, darunter einen Lysinrest und stellte das Hauptprodukt der tryptischen Spaltung der ACP-Komponente des Enzyms dar. Die Sequenzierung dieses Peptids ergab die folgende Primärstruktur:

Ser - Thr - Val - Gln - Asn - Glu - Ile - Leu - Gly - Asp - Leu
|
- Gly - Lys
O-Phosphopantethein-(^{14}C)Palmityl

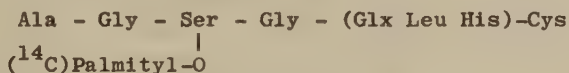
Zusammen mit den Ergebnissen von Ayling (14) konnte die Struktur am N-Terminus um die Teilsequenz (Asx, Val)-Gly-Gly-Lys-Ser..... erweitert werden. Der Vergleich des hieraus resultierenden Peptids mit einem gleichlangen Teilstück aus E. coli-ACP ergab:

- a) 5 Aminosäuren sind identisch
- b) 8 Aminosäuren könnten durch Mutation nur einer Base ineinander überführt werden
- c) 5 Aminosäuren können nur durch Veränderung von mehr als einer Base ineinander überführt werden.

Aus den Ergebnissen wurde geschlossen:

ACP aus FSS (Hefe) und ACP (*E. coli*) haben in den verglichenen Proteinabschnitten in der Umgebung des Phosphopanteins keine identische Primärstruktur. Die Aminosäuresequenzen sind jedoch offensichtlich - entwicklungsgeschichtlich - miteinander verwandt.

Aus dem Rückstand der tryptischen Spaltung konnten durch Pepsineinwirkung und analoge Trennoperationen zwei Peptide der Palmityltransferase isoliert werden. Aminosäureanalyse und teilweise Sequenzierung ergab die folgende Struktur für das aktive Zentrum dieses Enzyms:



Die mögliche Identität dieses Peptids mit dem aktiven Zentrum der Malonyltransferase wurde diskutiert.

XII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Lynen, F. und Tada, M., Angew. Chem. 73, 513-519 (1961)
- 2) Lynen, F., Angew. Chem. 67, 463-470 (1955)
- 3) Lynen, F., Hopper-Kessel, I. und Eggerer, H., Biochem. Z. 340, 95-124 (1964)
- 4) Bresster, R. und Wakil, S. J., J. biol. Chem. 237, 1441-1448 (1962)
- 5) Brooks, J.L. und Stumpf, P.K., Arch. Biochem. Biophys. 116, 108-116 (1966)
- 6) Lynen, F., Sitzungsber. bayr. Akad. Wiss., Sitzung vom 4. März 1960
- 7) Lynen, F., Federation Proc. 20, 941-951 (1961)
- 8) Vagelos, P.R., Majerus, P.W., Aberts, A.W., Larrabee, A.R. und Ailhaud, G.P., Federation Proc. 25, 1485-1494 (1966)
- 9) Hsu, R.Y., Wasson, G. und Porter J.W., J. biol. Chem. 240, 3736 - 3746 (1965)
- 10) Sumper, M. und Lynen, F., FEBS-Letters 28, 142-144 (1972)
- 11) Schweizer, E., Willecke, K., Winnewisser, W. und Lynen, F., Vitamins and Hormones 28, 329-343 (1970)
- 12) Sumper, M., Dissertation, Universität München (1970)
- 13) Lust, G. und Lynen, F., Europ. J. Biochem. 7, 68-72 (1968)
- 14) Ayling, J., Pirson, R. und Lynen, F., Biochem. 11, 526-533 (1972)
- 15) Schweizer, E., Kniep, B., Castorph, H. und Holzner, U., Eur. J. Biochem. 39, 353-362 (1973)
- 16) Prescott, D.J. und Vagelos, P.R., Adv. Enzymology 36, 269 -311 (1972)
- 17) Schweizer, E., Kühn, L. und Castorph, H., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352, 377-384 (1971)
- 18) Hagen, A., Dissertation, Universität München (1963)
- 19) Oesterheld, D., Dissertation, Universität München (1967)
- 20) Hirs, C.H.W., Methods in Enzymology XI, 197-199. Acad. Press, New York, 1967
- 21) Wieland, T., Angew. Chem. 65, 186-187 (1953)
- 22) Schultz, J., Dissertation, Universität München (1968)
- 23) Keil, B., The Enzymes Vol. III, Acad. Press, New York 1974
- 24) Ziegenhorn, J., Dissertation, Universität München (1970)
- 25) Hartley, B.S., persönliche Mitteilung

- 26) Bennett, J.C., Methods in Enzymology Vol. XI, Acad. Press, New York, 1967
- 27) High Voltage Electrophoresis Guide. Savant Instruments. Hicksville, New York
- 28) Sephadex-Gelfiltration in Theorie und Praxis. Pharmacia, Uppsala
- 29) Rouser, G., Kritchevsky, G., Yamamoto, A., Simon, G., Galli, C. und Bauman, A.J., Methods in Enzymology, Vol. XIV, 272-300, Acad. Press, New York, 1969
- 30) Sanger, F., Biochem. J. 44, 126-128 (1949)
- 31) Vanaman, T.C., Wakil, S.J., and Hill, R.L., J. biol. Chem. 243, 6420-6431 (1968)
- 32) Pataki, G., Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie. deGruyter, Berlin, 1966
- 33) Kresze, G.B., unveröffentlichte Versuche
- 34) Gray, W.R., Methods in Enzymology, Vol. XXV, 121-138. Acad. Press, New York, 1972
- 35) Perham, R.N. and Harris, I., EMBO Course on Protein Sequence Analysis. März 1974, Cambridge
- 36) Brand, L., and Withelt, B., Methods in Enzymology Vol. XI, 776-855. Acad. Press, New York, 1967
- 37) Edman, P., 'Sequence Determination' in Mol. Biol. Biochem. and Biophys. Vol. 8, 211-335. Springer Verlag, Berlin, 1970
- 38) Patchornik, A. und Sokolovsky, M., J. Am. chem. Soc. 86, 1206-1212 (1964)
- 39) Majerus, P.W., Alberts, A.W., and Vagelos, P.R., J. biol. Chem. 240, 4723-4726 (1965)
- 40) McGregor, W.H. und Carpenter, F.H., Biochemistry 1, 53-60 (1962)
- 41) Peterson, J.D., Nehrlich, S., Oyer, P.E., and Donald. F. Steiner, J. biol. Chem. 247, 4866-4871 (1972)
- 42) Summers, M.R., Smythers, G.W., and Stephen Oroszlan, Analyt. Biochem. 53, 624-628 (1973)
- 43) Smithies, O., Gibson, D., Fanning, E.M., Goodfliesh, R.M., Gilman, J.G., and Ballantyne, D.L., Biochemistry 10, 4912-4916 (1971)
- 44) Roncari, D.W.K., Bradshao, R.A., and Vagelos, P.R., J. biol. Chem. 247, 6234-6242 (1972)

- 45) Schweizer, E., Piccinini, F., Duba, C., Günther, S.,
Ritter, E. und Lynen, F., Eur J. Biochem. 15,
483-499 (1970)
- 46) Schweizer, E., persönliche Mitteilung
- 47) Simon, E.J., and Shemin, P.I., J. Amer Chem. Soc. 75,
2520 (1953)
- 48) Eggerer, H. und Lynen, F., Biochem. Z. 335, 540-547 (1962)
- 49) Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czed, R.,
Carbade, K.H., Meyer-Ahrendt, E. und Pfeleiderer, G.,
Z. f. Naturf. 8 b, 555-577 (1953)
- 50) Warburg, O. und Christian, Biochem Z. 310,
384-421 (1942).
- 51) Buckel, W. und Eggerer, H., Biochem. Z. 434, 29-43
(1965)
- 52) Aminosäureanalyse, Handbuch, Biotronik
- 53) Bergmeyer, H.U., Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim 1970.

LEBENS LAUF

Am 21.10. 1946 wurde ich als Sohn des Verlagskaufmanns Hans-Heinrich Schreckenbach und seiner Frau Cläre Schreckenbach, geb. Berger, in Hamburg geboren. Nach Beendigung der Volksschule besuchte ich ein altsprachliches Gymnasium in Hamburg, an welchem ich 1966 das Abitur ablegte. Von 1966 - 1967 leistete ich als Kriegsdienstverweigerer den zivilen Ersatzdienst beim Deutschen Roten Kreuz ab. Im Anschluß daran studierte ich an der Universität München Chemie und legte im Herbst 1971 die mündliche Diplomhauptprüfung ab. Von 1971 bis Herbst 1974 fertigte ich am Institut für Biochemie, Fachbereich Chemie und Pharmazie der Universität München, und am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen die vorliegende Diplom- und Doktorarbeit an.

